



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/12, 15/62, 15/86, G01N 33/68</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/16873</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. April 1999 (08.04.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/02898</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 25. September 1998 (25.09.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 197 42 706.5 26. September 1997 (26.09.97) DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: SKERRA, Arne [DE/DE]; Max-Lehner-Strasse 18, D-85354 Freising (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BESTE, Gerald [DE/DE]; Gagerstrasse 8, D-64283 Darmstadt (DE). SCHMIDT, Frank [DE/DE]; Letzter Hasenpfad 8, D-60598 Frank- furt (DE). STIBORA, Thomas [DE/DE]; Mozartstrasse 9, D-64331 Weiterstadt (DE).</p> <p>(74) Anwalt: VIERING, JENTSCHURA & PARTNER; Essener Strasse 5, D-46047 Oberhausen (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	

(54) Title: **ANTICALINS**

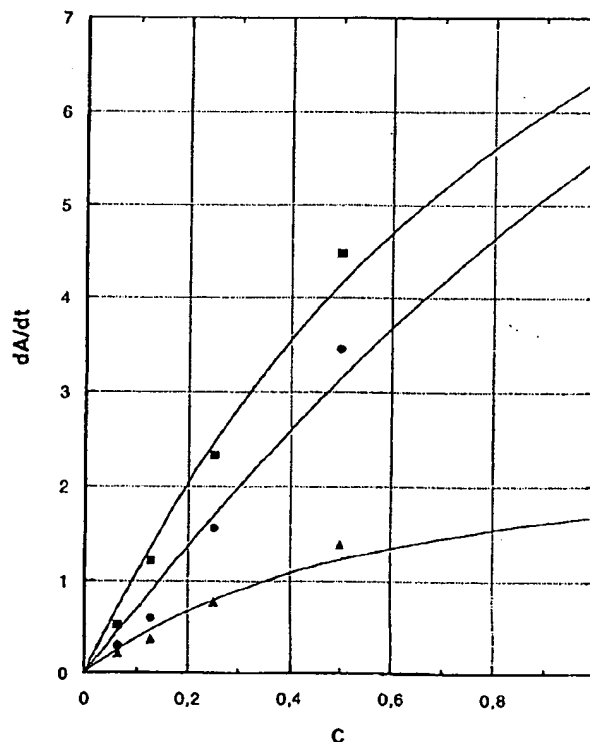
(54) Bezeichnung: **ANTICALINE**

(57) Abstract

The invention relates to the production of novel proteins exhibiting bonding activity for certain ligands, the so-called anticalins. To this end, the structure of peptides of the lipocalin family is modified by amino acid replacement in their natural ligand binding pocket using genetic engineering methods. Alike immunoglobulin, the anticalin thus obtained can be used to identify or bond molecular structures.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung bezieht sich auf die Herstellung neuer Proteine mit Bindungsaktivität für vorgegebene Liganden, sogenannte Anticaline. Dazu wird die Struktur von Polypeptiden der Lipocalinfamilie durch Austausch von Aminosäuren in deren natürlicher Liganden-Bindungstasche mittels gentechnischer Methoden abgewandelt. Dabei werden die Anticaline erhalten, die ähnlich wie die Immunglobuline zur Erkennung oder Bindung molekularer Strukturen eingesetzt werden können.



BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Anticaline

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Polypeptide, Verfahren
zu ihrer Herstellung sowie ihre Verwendung zur Bindung oder
5 Erkennung vorgegebener Liganden.

Die Lipocaline (Pervaiz and Brew, FASEB J. 1 (1987), 209-214)
sind eine Familie kleiner, oft monomerer sekretorischer
Proteine, die aus unterschiedlichen Organismen isoliert
10 wurden, und deren physiologische Rolle in der Speicherung oder
dem Transport verschiedener Liganden, wie auch in komplexeren
biologischen Funktionen besteht (Flower, Biochem. J. 318
(1996), 1-14). Die Lipocaline weisen untereinander relativ
geringe Sequenzähnlichkeit auf, und ihre Zugehörigkeit zu
15 derselben Proteinstrukturfamilie wurde erst durch die
Röntgenstrukturanalyse aufgedeckt (Sawyer et al., Nature 327
(1987), 659).

Das erste Lipocalin mit bekannter Raumstruktur war das
20 menschliche Retinol-Bindungsprotein, Rbp, das den Transport
des wasserunlöslichen Vitamin A im Blutserum bewirkt (Newcomer
et al., EMBO J. 3 (1984), 1451-1454). Kurze Zeit später wurde
die Tertiärstruktur des Bilin-Bindungsproteins, Bbp, aus dem
Schmetterling *Pieris brassicae* aufgeklärt (Huber et al., J.
25 Mol. Biol. 195 (1987), 423-434). Anhand der Raumstruktur
dieses Lipocalins, die in Figur 1A schematisch wiedergegeben
ist, lassen sich die wesentlichen Strukturmerkmale dieser
Proteinklasse erläutern. Zentrales Element in der
Faltungsarchitektur der Lipocaline ist die zylindrische
30 Faltblattstruktur, das sogenannte β -Barrel, die sich aus acht
nahezu kreisförmig angeordneten antiparallelen β -
Faltblattsträngen zusammensetzt.

Dieses Supersekundärstrukturelement läßt sich auch als
35 "Sandwich"-Anordnung zweier viersträngiger β -
Faltblattstrukturen auffassen. Zusätzliche Strukturelemente

sind ein gestrecktes Segment am Aminotermius der Polypeptidkette und eine α -Helix in der Nähe des Carboxyterminus, die wiederum von einem gestreckten Segment gefolgt ist. Diese zusätzlichen Merkmale sind jedoch nicht notwendigerweise in allen Lipocalinen ausgeprägt. So fehlt z.
5 B. ein erheblicher Teil des N-terminalen Segments in dem epididymalen Retinsäure-Bindungsprotein (Newcomer, Structure 1 (1993), 7-18). Ferner sind auch zusätzliche, spezielle Strukturelemente bekannt, wie beispielsweise Membrananker
10 (Bishop und Weiner, Trends Biochem. Sci. 21 (1996), 127), die nur in bestimmten Lipocalinen vorkommen.

An einem Ende ist das β -Barrel durch dichte Aminosäurepackung sowie durch Schleifensegmente verschlossen. Am anderen Ende
15 bildet das β -Barrel eine Bindungstasche, in der der jeweilige Ligand des Lipocalins komplexiert wird. Dort sind die acht benachbarten antiparallelen β -Faltblattstränge jeweils paarweise durch Kehren in der Polypeptidkette verbunden, die zusammen mit den angrenzenden Aminosäuren, die sich teilweise
20 noch im Bereich der zylindrischen Faltblattstruktur befinden, jeweils ein Schleifensegment bilden. Die Bindungstasche für den Liganden wird von diesen insgesamt vier Peptidschleifen gebildet. Im Fall des Bbp wird das Biliverdin IX γ in dieser Bindungstasche komplexiert. Ein anderer typischer Ligand für
25 Lipocaline ist das Vitamin A im Fall des Rbp wie auch des β -Lactoglobulins (Papiz et al., Nature 324 (1986), 383-385).

Gegenüberstellungen der Sequenzen von verschiedenen Vertretern der Lipocalinfamilie sind unter anderem in der
30 Veröffentlichung von Cowan et al. (Proteins: Struct., Funct., Genet. 8 (1990), 44-61) und in dem Übersichtsartikel von Flower (FEBS Lett. 354 (1994), 7-11) zu finden. Unter den derzeit weit mehr als 20 unterschiedlichen bekannten Lipocalinen befinden sich vor allem zwei menschliche Proteine,
35 die bereits näher biochemisch charakterisiert wurden: das Retinol-Bindungsprotein und das Apolipoprotein D, ApoD (Yang

et al., Biochemistry 33 (1994), 12451-12455). Das ApoD ist besonders interessant, da es enge strukturelle Verwandtschaft mit dem oben erwähnten Bbp aufweist (Peitsch und Boguski, New Biologist 2 (1990), 197-206).

5

Ein klassisches Beispiel für Proteine, die mittels nicht kovalenter Wechselwirkungen Liganden selektiv binden, stellen die Antikörper, d. h. Immunglobuline, dar. Diese Proteine spielen als Reagenzien auf den Gebieten der Biotechnologie, der Medizin, der Bioanalytik sowie ganz allgemein in den Biowissenschaften eine herausragende Rolle. Trotz der Vielfalt der gegebenen Einsatzmöglichkeiten im Zusammenhang mit der Erkennung, Bindung oder Abtrennung von Liganden werden heute beinahe ausschließlich Immunglobuline für entsprechende Zwecke eingesetzt. Die Anwendung anderer Proteine mit definierten Liganden-Bindungseigenschaften, wie z. B. der Lektine, ist dagegen auf Spezialfälle beschränkt geblieben.

Spezifische Antikörper lassen sich gegen verschiedenartigste Zielstrukturen, sogenannte Haptene bzw. Antigene, gezielt herstellen. Neben dem inzwischen allgemein etablierten Verfahren zur Produktion monoklonaler Antikörper werden dazu neuerdings auch biosynthetische Methoden eingesetzt, beispielsweise unter Verwendung der "Phage Display"-Technik (Hoess, Curr. Opin. Struct. Biol. 3 (1993), 572-579; Wells and Lowman, Curr. Opin. Struct. Biol. 2 (1992), 597-604). Ist erst einmal die genetische Information für die Bindungsregion (variable Domänen VH und VL) eines Immunglobulins mit der gewünschten Hapten- oder Antigenspezifität bekannt, so stehen dem Fachmann für die Produktion dieses Antikörpers, seiner Fragmente oder davon abgeleiteter Hybridproteine zahlreiche gentechnische Verfahren unter Verwendung von eukaryontischen oder bakteriellen Expressionssystemen zur Verfügung. Dennoch zeichnen sich mitunter Nachteile beim praktischen Einsatz dieser Proteinklasse ab.

35

Beispielsweise ist es bei medizinischen Anwendungen wie z. B.

dem "Tumor Imaging" oder dem "Drug Targeting" (Chester und Hawkins, Trends Biotechnol. 13 (1995) 294-300) wünschenswert, möglichst kleine Bindungsdomänen einzusetzen, da man sich davon eine verbesserte Gewebepenetration verspricht. Nach allgemeiner Ansicht ist das Fv-Fragment, welches sich aus der variablen Domäne der leichten Polypeptidkette (VL) und der variablen Domäne der schweren Polypeptidkette (VH) eines Antikörpers zusammensetzt, in der Regel das kleinste Immunglobulinfragment, welches eine strukturell intakte Antigen-Bindungsstelle ausbildet. Typischerweise besteht ein Fv-Fragment allerdings aus ungefähr 240 Aminosäuren, so daß ein solches Protein immer noch verhältnismäßig große Moleküldimensionen aufweist.

Des weiteren kann der Aufbau der Antikörper aus zwei verschiedenen Polypeptidketten (leichte und schwere Kette) zu unerwünschten Effekten führen. Da jeweils ein Paar kodierender Regionen kloniert und ggf. exprimiert werden muß, ist die gentechnische Produktion und Handhabung im Vergleich zu Proteinen aus einer einzelnen Polypeptidkette erschwert. Zudem hat sich gezeigt, daß Fv-Fragmente nicht selten über geringe proteinchemische Stabilität verfügen, da ihre VL- und VH-Domänen bloß über nicht kovalente Wechselwirkungen aneinander gebunden sind. Mit verschiedenen Strategien wurde daher schon versucht, die Assoziation der beiden variablen Domänen in dem heterodimeren Fv-Fragment zu stabilisieren. Eine dieser Methoden bedient sich der Verknüpfung der beiden Polypeptidketten auf der Ebene der Translation, wobei sogenannte scFv-Fragmente (Bird und Walker, Trends Biotechnol. 9 (1991), 132-137) erhalten werden. Allerdings hat sich gezeigt, daß diese Vorgehensweise mitunter andere Nachteile mit sich bringt, wie zum Beispiel Einbußen in der Affinität für den Liganden oder ein unerwünschtes Oligomerisierungsverhalten (Desplancq et al., Protein Eng. 7 (1994), 1027-1033).

Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, andere

Polypeptidreagenzien, die wie die Antikörper spezifische Bindungseigenschaften für vorgegebene Liganden aufweisen, zu entwickeln. Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe gelöst mit den Anticalinen, die herstellbar sind ausgehend von Polypeptiden der Lipocalinfamilie, indem Aminosäuren im Bereich der vier Peptidschleifen, die an einem Ende der zylindrischen Faltblattstruktur angeordnet sind, mutiert werden, und die dadurch charakterisiert sind, daß sie einen vorgegebenen Liganden mit bestimmbarer Affinität binden.

Ein topographischer Vergleich des Verlaufs der Polypeptidkette in der Proteinfaltung der Lipocaline mit den Fv-Fragmenten der Immunglobuline wird aus Figur 2 ersichtlich. In den Immunglobulinen wird die Bindungsstelle für das Antigen von sechs strukturell hypervariablen Peptidschleifen, auch CDRs (engl.: Complementarity Determining Regions) genannt, gebildet. Beide variable Domänen, VH und VL, tragen drei CDRs zur Antigen-Bindungsstelle bei. Die beiden variablen Domänen bestehen jeweils aus zwei schichtartig angeordneten β -Faltblattstrukturen, die das strukturell konservierte Gerüst bilden, welches die hypervariablen Peptidschleifen trägt. In dem Fv-Fragment entsteht so ein innerer und ein äußerer Ring von β -Faltblattsträngen, wobei zwei CDRs zwischen benachbarten Strängen des inneren Rings und vier CDRs zwischen Strängen des inneren und des äußeren Rings aufgespannt sind.

Im Vergleich dazu sind die Liganden-Bindungsstellen der Lipocaline einfacher aufgebaut. In diesem Fall liegt nur ein Ring von 8 antiparallelen β -Faltblattsträngen vor: das β -Barrel. Diese zyklische Faltblattstruktur ist in der Proteinfaltung der Lipocaline konserviert. Die Bindungsstelle wird im Eingangsbereich des β -Barrels von den vier Peptidschleifen gebildet, die jeweils zwei benachbarte β -Faltblattstränge miteinander verbinden. Diese Peptidschleifen können sich in ihrer Struktur erheblich zwischen den einzelnen Mitgliedern der Lipocalinfamilie unterscheiden.

Trotz der scheinbaren Analogie im strukturellen Aufbau der Immunglobuline und der Lipocaline, d. h. konservierte Gerüstbereiche einerseits und hypervariable, spezifitätsbestimmende Abschnitte andererseits, gibt es einen wesentlichen Unterschied zwischen diesen beiden Proteinklassen. Während nämlich im menschlichen Körper ca. 100 Millionen verschiedene Antikörper zirkulieren und ständig neu gebildet werden, bringt derselbe Organismus nur wenige verschiedene Lipocaline - wie z. B. das oben erwähnte Rbp oder das ApoD - hervor. Entstehen im Immunsystem eines Säugetiers durch somatische Genrekombination und Mutation fortwährend Antikörper mit neuen Antigen-spezifitäten, so sind die Lipocaline im Gegensatz dazu im Verlauf der Evolution in der Struktur und Funktion ihrer jeweiligen Liganden-Bindungsstellen weitestgehend konserviert geblieben. Als Beispiel dafür kann das Rbp dienen, dessen Aminosäuresequenz aus verschiedenen Organismen bekannt ist. Der Sequenzvergleich mit dem menschlichen Rbp (SWISS-PROT Datenbank-Zugriffscod P02753) zeigt, daß beispielsweise zu dem Rbp des Schweins (SWISS-PROT Datenbank-Zugriffscod P27485) bloß 13 und zu dem des Rinds (SWISS-PROT Datenbank-Zugriffscod P18902) bloß 14 Unterschiede bestehen. Alle diese Aminosäuresubstitutionen befinden sich zudem in der Raumstruktur fernab der Bindungsstelle für das Retinol (s. die Figur 13 in der Veröffentlichung von Cowan et al., supra).

In dem erfindungsgemäßen Verfahren wird diese Lücke zwischen den funktionellen Eigenschaften der Antikörper und der Lipocaline geschlossen, indem eine oder mehrere der vier Peptidschleifen, die die Liganden-Bindungsstelle eines Lipocalins bilden, einer Mutagenese unterzogen werden und im Anschluß daran solche Proteinvarianten (Muteine) ausgewählt, d. h. selektiert werden, die die gewünschte Bindungsaktivität für einen vorgegebenen Liganden aufweisen. Die dabei erhaltenen Lipocalinmuteine werden hier als Anticaline bezeichnet.

Im folgenden wird an einem Beispiel, nämlich dem Bbp, erläutert, was unter dem Begriff Peptidschleifen in dieser Erfindung anhand der Polypeptidsequenz verstanden werden soll. Die vier Peptidschleifen der Lipocaline, die bei der

5 erfindungsgemäßen Herstellung der Anticaline durch Mutagenese in ihrer Sequenz abgewandelt werden, sind durch diejenigen Abschnitte in der linearen Polypeptidsequenz gekennzeichnet, die die Aminosäurepositionen 28 bis 45, 58 bis 69, 86 bis 99 und 114 bis 129 des Bbp umfassen. Diese Sequenzabschnitte

10 beginnen jeweils vor dem C-Terminus eines der konservierten β -Faltblattstränge an der offenen Seite des β -Barrels, schließen die eigentliche Peptidkehre ein, und enden nach dem N-Terminus des in der Sequenz folgenden, ebenfalls konservierten β -Faltblattstrangs.

15 Anhand veröffentlichter oder vom Fachmann selbst durchführbarer Sequenz-Gegenüberstellungen (Alignments) oder Strukturüberlagerungen läßt sich die Definition der für das Bbp angegebenen Sequenzpositionen auf andere Lipocaline übertragen. Beispielsweise kann man aus der in Figur 3

20 wiedergegebenen Sequenz-Gegenüberstellung, die dem von Peitsch und Boguski (New Biologist 2 (1990), 197-206) veröffentlichten Alignment entspricht, ablesen, daß die vier Peptidschleifen im Fall des ApoD die Aminosäurepositionen 28 bis 44, 59 bis 70,

25 85 bis 98 und 113 bis 127 umfassen. Mit der beschriebenen Vorgehensweise ist es möglich, auch in neuen Lipocalinen die entsprechenden Peptidschleifen zu identifizieren, die sich für eine erfindungsgemäße Mutagenese eignen.

30 Als problematisch bei der Ermittlung der konservierten β -Faltblattstränge kann sich in manchen Fällen die relativ schwach ausgeprägte Sequenzhomologie der Lipocaline erweisen. Entscheidend ist daher die Fähigkeit der Polypeptidsequenz, die zyklische Faltblattstruktur aus 8 antiparallelen β -

35 Faltblattsträngen auszubilden. Diese läßt sich ggf. unter Einsatz strukturanalytischer Methoden wie der

Proteinkristallographie oder der multidimensionalen Kernresonanz-Spektroskopie nachweisen.

Die zur Mutagenese geeigneten Sequenzabschnitte können bei
5 anderen Lipocalinen, wie z. B. dem ApoD oder dem Rbp, aufgrund
der jeweils variierenden Struktur der Peptidschleifen durchaus
länger oder kürzer sein als beim Bbp (vgl. Figur 3). Es kann
sogar von Vorteil sein, einen oder mehrere der
Sequenzabschnitte durch Deletion oder Insertion von einer oder
10 mehreren Aminosäuren zusätzlich in seiner Länge zu verändern.
In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung werden
diejenigen Aminosäurepositionen in diesen Sequenzabschnitten,
die den Sequenzpositionen 34 bis 37, 58, 60, 69, 88, 90, 93,
95, 97, 114, 116, 125 und 127 des Bbp entsprechen, und die in
15 den Figuren 1B und 3 hervorgehoben sind, mutiert. Im Fall des
ApoD sind demgemäß die Sequenzpositionen 34 bis 37, 59, 61,
70, 87, 89, 92, 94, 96, 113, 115, 123 und 125 für die
Mutagenese bevorzugt. Für die Herstellung von Anticalinen
müssen jedoch nicht alle hier angegebenen Sequenzpositionen
20 einer Mutagenese unterzogen werden.

Als Grundstruktur zur Herstellung von Anticalinen sind
selbstverständlich neben den hier genannten Beispielen auch
andere Lipocaline geeignet. Bevorzugt sind die zur Zeit
25 bereits sehr gründlich biochemisch untersuchten Lipocaline
Rbp, Bbp oder ApoD zu verwenden. Besonders bevorzugt sind
Lipocaline humanen Ursprungs zur Herstellung von Anticalinen
zu verwenden. Dies gilt vor allem, wenn eine Anwendung des
oder der resultierenden Anticaline am Menschen beabsichtigt
30 ist, da beispielsweise bei diagnostischen oder therapeutischen
Anwendungen *in vivo* im Vergleich zu den Lipocalinen aus
anderen Organismen minimale immunogene Wirkung zu erwarten
ist. Jedoch können sich auch andere und ggf. künftig erst neu
zu entdeckende Lipocaline als besonders vorteilhaft zur
35 Herstellung von Anticalinen erweisen. Ebenso können künstliche
Proteine mit einem dem β -Barrel der Lipocaline strukturell
äquivalenten Faltungselement dazu verwendet werden.

Vorzugsweise sollen die erfindungsgemäßen Anticaline den gewünschten Liganden mit bestimmbarer Affinität, d. h. mit einer Affinitätskonstante von mindestens 10^5 M^{-1} binden. Niedrigere Affinitäten lassen sich mit den üblichen Meßmethoden in der Regel nicht mehr exakt erfassen und sind daher für praktische Anwendungen von untergeordneter Bedeutung. Besonders bevorzugt sollen die Anticaline den gewünschten Liganden mit einer Affinität von mindestens 10^6 M^{-1} , entsprechend einer Komplex-Dissoziationskonstante von $1 \mu\text{M}$, binden. Die Bindungsaffinität eines Anticalins zu dem gewünschten Liganden kann vom Fachmann mit einer Vielzahl von Methoden ermittelt werden, beispielsweise mit dem Verfahren der Fluoreszenztitration, durch Kompetitions-ELISA oder mittels der Oberflächen-Plasmonresonanztechnik.

Als Ausgangspunkt zur Mutagenese der Peptidschleifen kann die cDNA eines Lipocalins dienen, die mit dem Fachmann bekannten Methoden hergestellt und kloniert werden kann, wie es beispielsweise für das Bbp beschrieben wurde (Schmidt und Skerra, Eur. J. Biochem. 219 (1994), 855-863). Alternativ kann auch genomische DNA eingesetzt oder eine Gensynthese oder eine Kombination dieser Verfahren durchgeführt werden. Zur Mutagenese der Aminosäuren in den vier Peptidschleifen stehen dem Fachmann die verschiedenen bekannten Verfahren zur ortsspezifischen Mutagenese oder zur Mutagenese mittels der Polymerase-Kettenreaktion zur Verfügung. Die Mutageneseverfahren können beispielsweise dadurch gekennzeichnet sein, daß Mischungen synthetischer Oligodesoxynukleotide, die an den gewünschten Positionen degenerierte Basenzusammensetzung aufweisen, zur Einführung der Mutationen verwendet werden. Auch der Einsatz von Nukleotidbausteinen mit reduzierter Basenpaarungsspezifität, wie z. B. Inosin, kommt zur Einführung von Mutationen in den ausgewählten Sequenzabschnitten oder Aminosäurepositionen in Betracht. Im Vergleich zu den Antikörpern ist die Vorgehensweise zur Mutagenese der Liganden-Bindungsstelle vereinfacht, da bei den Lipocalinen dafür nur vier anstelle

von sechs Sequenzabschnitten - entsprechend den vier oben genannten Peptidschleifen - manipuliert werden müssen.

- Bei den Methoden der ortsgerichteten Zufallsmutagenese unter Einsatz von synthetischen Oligodesoxynukleotiden lassen sich die betreffenden Aminosäurepositionen in der Lipocalinstruktur, die mutiert werden sollen, vorherbestimmen. Die ideale Auswahl der zu mutierenden Aminosäurepositionen kann von dem verwendeten Lipocalin einerseits und dem gewünschten Liganden andererseits abhängen. Dabei kann es sinnvoll sein, die Gesamtzahl der mutierten Aminosäurepositionen innerhalb eines Experiments so gering zu halten, daß die Sammlung der bei der Mutagenese erhaltenen Varianten, d. h. die sogenannte Bibliothek, in ihrer Gesamtheit oder wenigstens in einer repräsentativen Auswahl davon sowohl auf der Ebene der kodierenden Nukleinsäure als auch auf der Ebene der Genprodukte in ihrer kombinatorischen Komplexität möglichst vollständig realisiert werden kann.
- Die zu mutierenden Aminosäurepositionen sollten sich vor allem dann sinnvoll auswählen lassen, wenn Strukturinformationen über das verwendete Lipocalin selbst, wie im Fall des Rbp und des Bbp, oder zumindest über ein Lipocalin mit ähnlicher Struktur vorliegen, wie z. B. im Fall des ApoD. Der Satz der ausgewählten Aminosäurepositionen kann außerdem von den Eigenschaften des gewünschten Liganden abhängen. Z. B. kann es im Fall eines kleinen, haptentartigen Liganden sinnvoll sein, vor allem Aminosäurepositionen am Zentrum der Liganden-Bindungstasche, also noch in oder nahe dem Bereich des β -Barrels, der Mutagenese zu unterziehen. Im Fall eines größeren, antigenartigen Liganden dagegen sollte die Mutagenese auch diejenigen Aminosäurepositionen in den Peptidschleifen betreffen, die besonders exponiert an der Proteinoberfläche angeordnet sind, und die sich eher in der Mitte der entsprechenden Sequenzabschnitte befinden. Abgesehen von einer solchen funktionellen Betrachtung kann es sich zudem als vorteilhaft erweisen, einzelne Aminosäurepositionen im

Bereich der Liganden-Bindungstasche von einer Mutagenese auszunehmen, wenn diese sich beispielsweise als essentiell für die Faltungseffizienz oder -stabilität des Proteins erweisen.

- 5 Eine der zahlreichen anwendbaren Methoden zur Einführung von Mutationen im Bereich der vier Peptidschleifen eines Lipocalins basiert auf der Verwendung von vier Oligodesoxynukleotiden, die jeweils von einem der vier entsprechenden zu mutierenden Sequenzabschnitte abgeleitet
10 sind. Bei der Herstellung dieser Oligodesoxynukleotide kann der Fachmann zur Synthese derjenigen Nukleotidtripletts, die den zu mutierenden Aminosäurepositionen entsprechen, Gemische von Nukleinsäurebausteinen einsetzen, so daß zufällig Codons bzw. Anticodons für alle Aminosäuren oder, gemäß dem
15 genetischen Code und der Zusammensetzung dieser Mischung, für eine Auswahl der an dieser Position gewünschten Aminosäuren zustandekommen.

- Beispielsweise entspricht das erste Oligodesoxynukleotid in
20 seiner Sequenz - abgesehen von den mutierten Positionen - zumindest teilweise dem kodierenden Strang für diejenige Peptidschleife, die in der Polypeptidsequenz des Lipocalins am weitesten N-terminal liegt. Das zweite Oligodesoxynukleotid entspricht demgemäß zumindest teilweise dem nichtkodierenden
25 Strang für den in der Polypeptidsequenz folgenden zweiten Sequenzabschnitt. Das dritte Oligodesoxynukleotid entspricht wiederum zumindest teilweise dem kodierenden Strang für den entsprechenden dritten Sequenzabschnitt. Das vierte Oligodesoxynukleotid entspricht schließlich zumindest
30 teilweise dem nichtkodierenden Strang für den vierten Sequenzabschnitt. Mit dem ersten und zweiten Oligodesoxynukleotid sowie mit dem dritten und vierten Oligodesoxynukleotid kann jeweils eine Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung der für das Lipocalin
35 kodierenden Nukleinsäure und/oder ihres Gegenstrangs als Matrize durchgeführt werden.

Die Amplifizierungsprodukte dieser beiden Reaktionen können durch verschiedene bekannte Methoden zu einer Nukleinsäure zusammengesetzt werden, welche die Sequenz von dem ersten bis zum vierten Sequenzabschnitt umfaßt und die Mutationen an den ausgewählten Aminosäurepositionen trägt. Beispielsweise können die beiden Produkte dazu einer erneuten Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung flankierender Oligodesoxynukleotide als Primer sowie eines oder mehrerer vermittelnder Nukleinsäuremoleküle, die die Sequenz zwischen dem zweiten und dem dritten Sequenzabschnitt beitragen, unterzogen werden. Diese Vorgehensweise ist in Figur 4 schematisch wiedergegeben. Bei der Wahl der Anzahl der zur Mutagenese verwendeten Oligodesoxynukleotide und deren Anordnung innerhalb der Gensequenz des Lipocalins stehen dem Fachmann darüber hinaus vielfältige Alternativen zur Verfügung.

Die Nukleinsäuremoleküle, die für den Sequenzbereich mit den vier Peptidschleifen eines Lipocalins kodieren und Mutationen an den ausgewählten Positionen enthalten, können durch Ligierung mit den fehlenden 5'- und 3'-Sequenzen einer für das Lipocalin kodierenden Nukleinsäure verbunden und in einem der bekannten Wirtsorganismen kloniert werden. Für die Ligierung und Klonierung stehen wiederum vielfältige Vorgehensweisen zur Verfügung. Beispielsweise können im Verlauf einer Amplifizierung synthetische Nukleinsäuremoleküle mit Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen, welche an den entsprechenden Positionen in der Nukleinsäuresequenz für das Lipocalin ebenfalls vorhanden sind, an den beiden Enden der zu klonierenden Nukleinsäure angefügt werden, so daß nach der Hydrolyse mit dem entsprechenden Restriktionsenzym eine Ligierung ermöglicht wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die gezielte Mutagenese einzelner Aminosäurepositionen innerhalb oder außerhalb der vier Peptidschleifen, beispielsweise um durch Einführung von Schnittstellen für bestimmte Restriktionsenzyme

die Subklonierung des mutierten Lipocalingens oder seiner Teile zu vereinfachen. Beispielsweise können in das Bbp-Gen die Mutationen Asn21 zu Gln und Lys135 zu Met eingeführt werden, um die Klonierung des mutierten Genabschnitts über
5 zwei neue *Bst*XI-Restriktionsschnittstellen an diesen Positionen zu erleichtern. Ebenso betrifft die vorliegende Erfindung die gezielte Einführung von Mutationen innerhalb oder außerhalb der vier Peptidschleifen, um bestimmte Eigenschaften des Anticalins zu verbessern, z. B. seine
10 Faltungsstabilität oder -effizienz oder seine Widerstandsfähigkeit gegenüber Proteasen. So kann beispielsweise durch den Aminosäureaustausch Lys87 zu Ser eine Spaltung des Bbp in zwei Fragmente, die ansonsten bei dessen Produktion in *E. coli* auftritt, unterdrückt werden. Eine
15 Oligomerisierung des ursprünglichen Bbp kann zudem durch die Mutation Asn1 zu Asp vermieden werden. Auch kann durch den Austausch Cys116 zu Ser im ApoD dessen kovalente Quervernetzung mit anderen Proteinen verhindert und seine monomere Struktur stabilisiert werden.

20 In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung dient dementsprechend die Bbp-Variante mit der Substitution Lys87 zu Ser als Grundstruktur zur Herstellung von Anticalinen. Besonders bevorzugt wird die Bbp-Variante mit den
25 Substitutionen Asn1 zu Asp, Asn21 zu Gln, Lys135 zu Met und Lys87 zu Ser zur Herstellung von Anticalinen eingesetzt.

Auch längere Sequenzabschnitte innerhalb des für das Lipocalin kodierenden Gens können mittels bekannter Methoden einer
30 Zufallsmutagenese unterworfen werden, z. B. durch Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion unter Bedingungen erhöhter Fehlerrate, durch chemische Mutagenese oder durch Verwendung bakterieller Mutatorstämme (Low et al., *J. Mol. Biol.* 260 (1996), 359-368). Derartige Methoden lassen sich auch zur
35 weiteren Optimierung der Ligandenaffinität oder -spezifität eines bereits hergestellten Anticalins verwenden. Mutationen, die dabei möglicherweise außerhalb der vier Schleifenregionen

auftreten, können oft toleriert werden oder sich sogar als günstig erweisen, wenn sie z. B. zu einer verbesserten Faltungseffizienz oder -stabilität des Anticalins beitragen.

- 5 Nachdem die der Mutagenese unterzogenen kodierenden Nukleinsäuresequenzen zur Expression gebracht worden sind, können aus den verschiedenen Klonen der erhaltenen Bibliothek diejenigen Klone selektiert werden, die die genetische Information für Anticaline tragen, welche einen vorgegebenen
- 10 Liganden binden. Zur Selektion dieser Klone können bekannte Expressionsstrategien und Selektionsstrategien eingesetzt werden. Derartige Methoden sind beispielsweise im Zusammenhang mit der Herstellung oder dem Engineering rekombinanter Antikörperfragmente beschrieben worden, wie die "Phage
- 15 Display"-Technik oder "Colony Screening"-Methoden (Skerra et al., Anal. Biochem. 196 (1991), 151-155).

- Als Beispiel für ein erfindungsgemäßes Selektionsverfahren für Anticaline mit den gewünschten Bindungseigenschaften sei hier
- 20 eine Ausführungsform der "Phage Display"-Technik (Hoess, supra; Wells and Lowman, supra; Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins - A Laboratory Manual (1996), Academic Press) genannt. Die verschiedenen anderen möglichen Ausführungsformen der "Phage Display"-Technik werden hiermit
- 25 per Referenz in die Offenbarung einbezogen. Für das beispielhafte Selektionsverfahren werden Phasmide hergestellt, welche die Expression des mutierten Lipocalin-Strukturgens als Fusionsprotein mit einer Signalsequenz am N-Terminus, bevorzugt der OmpA-Signalsequenz, und mit dem Hüllprotein pIII
- 30 des Phagen M13 (Model und Russel, in "The Bacteriophages", Vol. 2 (1988), Plenum Press, New York, 375-456) oder Fragmenten dieses Hüllproteins, welche in die Phagenhülle eingebaut werden, am C-Terminus bewirken. Bevorzugt wird das C-terminale Fragment Δ pIII des Phagen-Hüllproteins, welches
- 35 lediglich die Aminosäuren 217 bis 406 des natürlichen Hüllproteins pIII enthält, zur Herstellung der Fusionsproteine verwendet. Besonders bevorzugt wird ein C-terminales Fragment

von pIII, in dem der Cysteinrest an der Position 201 fehlt oder durch eine andere Aminosäure ersetzt ist.

Das Fusionsprotein kann noch weitere Bestandteile enthalten, wie z. B. ein Affinitätsanhängsel oder eine Epitopsequenz für einen Antikörper, die den Nachweis, die Immobilisierung oder die spätere Reinigung des Fusionsproteins oder seiner Teile gestattet. Ferner kann sich zwischen der für das Lipocalin oder Anticalin kodierenden Region und dem Genabschnitt für das Hüllprotein oder sein Fragment ein Stopcodon, vorzugsweise ein Amber-Stopcodon, befinden, das in einem geeigneten Suppressorstamm bei der Translation zumindest teilweise in eine Aminosäure übersetzt wird.

Als Phasmide werden hier bakterielle Plasmide bezeichnet, die die intergenische Region eines filamentösen Bakteriophagen, wie z. B. M13 oder f1 (Beck und Zink, Gene 16 (1981), 35-58) oder einen funktionellen Teil davon tragen, so daß bei Superinfektion der Bakterienzelle mit einem Helferphagen, beispielsweise M13K07, VCS-M13 oder R408, ein Strang der zirkulären Phasmid-DNA mit Hüllproteinen verpackt und als sogenanntes Phagemid in das Medium ausgeschleust wird. Dieses Phagemid hat einerseits das von dem jeweiligen Phasmid kodierte Lipocalinmurein als Fusion mit dem Hüllprotein pIII oder dessen Fragment an seiner Oberfläche eingebaut, wobei die Signalsequenz von dem Fusionsprotein in der Regel abgespalten wird. Andererseits trägt es eine oder mehrere Kopien des nativen Hüllproteins pIII von dem Helferphagen und ist somit in der Lage, einen Rezipienten - im allgemeinen einen Bakterienstamm, der ein F- oder F'-Plasmid trägt - zu infizieren. Auf diese Weise wird eine physikalische Kopplung zwischen der verpackten Nukleinsäure, die die genetische Information für das jeweilige Lipocalinmurein oder Anticalin trägt, und dem kodierten Protein gewährleistet, das zumindest teilweise in funktioneller Form an der Oberfläche des Phagemids präsentiert wird.

Zur Konstruktion der Phasmide mit den für die Bbp-Muteine kodierenden Sequenzen kann beispielsweise der Vektor pBBP20 (Figur 5) verwendet werden. Zur Selektion von Anticalinen ausgehend von einem anderen Lipocalin wird ein analoger Vektor hergestellt, indem die DNA-Sequenz, die für dieses Lipocalin oder seine Muteine kodiert, anstelle der für das Bbp kodierenden Sequenz in den Vektor pBBP20 inseriert wird. Im Fall des Bbp oder seiner Muteine kann die für die vier Peptidschleifen kodierende Nukleinsäure beispielsweise über die beiden *Bst*XI-Restriktionsschnittstellen in den Vektor pBBP20 inseriert werden. Rekombinante Phasmide werden durch Transformation in den *E. coli*-Stamm, beispielsweise XL1-Blue (Bullock et al., BioTechniques 5 (1987), 376-379) oder TG1, eingebracht. Auf diese Weise werden Klone hergestellt, die zahlreiche verschiedene Lipocalinmuteine als Fusionsproteine produzieren können.

Anschließend wird diese Bibliothek, d. h. die Sammlung der erhaltenen Klone, nach bekannten Verfahren in Flüssigkultur mit einem M13-Helferphagen superinfiziert. Nach dieser Infektion kann die Inkubationstemperatur der Kultur zur Produktion der Phagemide abgesenkt werden. Bevorzugt werden Inkubationstemperaturen, bei denen eine optimale Faltung der Lipocalinmuteine als Bestandteil des Fusionsproteins mit dem Phagenhüllprotein oder seinem Fragment zu erwarten ist. Während oder nach der Infektionsphase kann in den Bakterienzellen die Expression des Gens für das Fusionsprotein mit dem Lipocalinmucin induziert werden. Die Induktionsbedingungen werden so gewählt, daß ein erheblicher Teil der produzierten Phagemide mindestens ein Lipocalinmucin präsentiert. Die Phagemide werden nach einer Inkubationsphase der Kultur von beispielsweise 6 bis 8 h isoliert. Zur Isolierung der Phagemide sind verschiedene Verfahren, wie z. B. die Präzipitation mit Polyethylenglykol bekannt.

Die isolierten Phagemide können durch Inkubation mit dem gewünschten Liganden einer Selektion unterworfen werden, wobei

- der Ligand in einer Form vorliegt, die eine zumindest vorübergehende Immobilisierung derjenigen Phagemide ermöglicht, die Anticaline mit der gewünschten Bindungsaktivität als Fusionsprotein in ihrer Hülle tragen.
- 5 Unter den verschiedenen dem Fachmann bekannten Ausführungsformen kann der Ligand beispielsweise mit einem Trägerprotein, wie Serumalbumin, konjugiert und über dieses Trägerprotein an eine proteinbindende Oberfläche, beispielsweise Polystyrol, gebunden werden. Zu dieser
- 10 Immobilisierung des Liganden lassen sich bevorzugt die für ELISA-Techniken geeigneten Mikrotiterplatten oder sogenannte "Immuno-Sticks" verwenden. Alternativ können auch Konjugate des Liganden mit anderen bindefähigen Gruppen, wie z. B. Biotin, eingesetzt werden. Der Ligand läßt sich dann an
- 15 Oberflächen immobilisieren, die diese Gruppe selektiv binden, wie z. B. mit Streptavidin oder Avidin beschichtete Mikrotiterplatten oder paramagnetische Partikel.
- Vorhandene Proteinbindungsstellen an den mit dem Liganden
- 20 besetzten Oberflächen können mit den für ELISA-Verfahren bekannten Blockierungslösungen abgesättigt werden. Anschließend werden die Phagemide beispielsweise in einem physiologischen Puffer mit dem an der Oberfläche immobilisierten Liganden in Kontakt gebracht. Ungebundene
- 25 Phagemide werden durch mehrfaches Waschen entfernt. Die an der Oberfläche verbleibenden Phagemidpartikel werden anschließend eluiert. Zur Elution kann der freie Ligand in gelöster Form zugegeben werden. Die Phagemide können aber auch durch Zugabe von Proteasen oder unter mäßig denaturierenden Bedingungen, z.
- 30 B. in Gegenwart von Säuren, Laugen, Detergentien oder chaotropen Salzen, eluiert werden. Eine bevorzugte Methode ist die Elution mittels Puffern mit pH 2,2, wobei das Eluat anschließend neutralisiert wird.
- 35 Danach werden *E. coli*-Zellen mittels allgemein bekannter Methoden mit den eluierten Phagemiden infiziert. Die Nukleinsäure kann auch aus den eluierten Phagemiden extrahiert

und auf andere Weise in die Zellen eingebracht werden.
Ausgehend von den dabei erhaltenen *E. coli*-Klonen werden durch
Superinfektion mit M13-Helferphagen nach dem oben
beschriebenen Verfahren wiederum Phagemide erzeugt und die auf
5 diese Weise vermehrten Phagemide erneut einer Selektion an der
Oberfläche mit dem immobilisierten Liganden unterworfen. Oft
sind mehrere Selektionszyklen notwendig, um die Phagemide mit
den Anticalinen in angereicherter Form zu erhalten. Die Anzahl
der Selektionszyklen wird bevorzugt so gewählt, daß bei der
10 anschließenden funktionellen Analyse mindestens 0,1 % der
untersuchten Klone Lipocalinmuteine mit nachweisbarer oder
bestimmbarer Affinität zu dem vorgegebenen Liganden
produzieren. Abhängig vom Umfang, d. h. der Komplexität der
eingesetzten Bibliothek sind dazu typischerweise 2 bis 8
15 Zyklen notwendig.

Zur funktionellen Analyse der selektierten Muteine wird ein *E. coli*-Stamm mit den nach den Selektionszyklen erhaltenen
Phagemiden infiziert und die entsprechende doppelsträngige
20 Phasmid-DNA isoliert. Ausgehend von dieser Phasmid-DNA oder
auch von der aus den Phasmiden extrahierten einzelsträngigen
DNA kann die Nukleinsäuresequenz der selektierten
Lipocalinmuteine mittels der dazu üblichen Methoden bestimmt
und die Aminosäuresequenz daraus abgeleitet werden. Die
25 mutierte Region oder die Sequenz des gesamten Lipocalinmuteins
oder Anticalins kann in einem anderen Expressionsvektor
subkloniert und in einem geeigneten Wirtsorganismus exprimiert
werden. Als Expressionsvektor kann beispielsweise pBBP21
verwendet werden, und die Expression mit pBBP21-Derivaten kann
30 in *E. coli*-Stämmen, beispielsweise *E. coli*-TG1, durchgeführt
werden. Die gentechnisch hergestellten Anticaline können durch
verschiedene proteinchemische Verfahren gereinigt werden. Die
beispielsweise mit pBBP21 produzierten Anticaline tragen das
Affinitätspeptid Strep-Tag II (Schmidt et al., J. Mol. Biol.
35 255 (1996), 753-766) an ihrem C-Terminus und können daher
bevorzugt mittels der Streptavidin-Affinitätschromatographie
gereinigt werden.

Die Selektion kann ebenso mittels anderer Methoden durchgeführt werden. Eine Vielzahl entsprechender Ausführungsformen ist dem Fachmann bekannt oder in der Literatur beschrieben. Auch eine Kombination von Methoden kann angewandt werden. Beispielsweise können Klone, die durch "Phage Display" selektiert oder zumindest angereichert wurden, zusätzlich einem "Colony Screening" unterzogen werden. Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, daß dabei direkt einzelne Klone hinsichtlich der Produktion von Anticalinen mit nachweisbarer Bindungsaffinität für einen Liganden isoliert werden können.

Neben der Verwendung von *E. coli* als Wirtsorganismus bei der "Phage Display"-Technik oder der "Colony Screening"-Methode lassen sich beispielsweise auch andere Bakterienstämme, Hefen oder auch Insekten- oder Säugerzellen dazu heranziehen. Zusätzlich zur Selektion eines Anticalins aus einer primären Bibliothek, die ausgehend von einer kodierenden Nukleinsäuresequenz für ein Lipocalin hergestellt wurde, können vergleichbare Methoden auch angewandt werden, um ein Anticalin durch wiederholte, ggf. eingeschränkte Mutagenese seiner kodierenden Nukleinsäuresequenz hinsichtlich Affinität oder Spezifität für den gewünschten Liganden zu optimieren.

Es ist überraschend, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren Anticaline gewonnen werden können, die hohe Affinität zu einem vorgegebenen Liganden zeigen. Mit den in den Beispielen beschriebenen Anticalinen wurden für verschiedene Fluoresceinderivate Bindungskonstanten bestimmt, die mehr als 10^6 M^{-1} betragen. Diese Affinitätswerte liegen in derselben Größenordnung wie die Affinitäten der Lipocaline zu ihren natürlichen Liganden, beispielsweise von Rbp zu Vitamin A (Cogan et al., Eur. J. Biochem. 65 (1976), 71-78). Im Gegensatz zu den natürlichen Liganden der Lipocaline, die in der Regel wasserunlöslich und chemisch unbeständig sind, handelt es sich allerdings bei Fluorescein um eine relativ hydrophile Verbindung, die auch in immunologischen Studien als

Hapten mit Modellcharakter eingesetzt wurde (Voss, Fluorescein Hapten: An Immunological Probe (1984), CRC Press). Zudem zeigt das Fluorescein mit dem Biliverdin IX_y, dem ursprünglichen Liganden des Bbp, keinerlei strukturelle Verwandtschaft.

5

Solche mit den Anticalinen erzielbare Affinitäten für neue Liganden sind vergleichbar mit den Affinitäten, welche für Antikörper aus der sekundären Immunantwort bekannt sind.

10 Darüber hinaus besteht zusätzlich die Möglichkeit, die hergestellten Anticaline einer weiteren, ggf. partiellen Zufallsmutagenese zu unterwerfen, um aus der dabei erhaltenen neuen Bibliothek Varianten mit noch höherer Affinität zu selektieren. Entsprechende Vorgehensweisen wurden bereits im Fall rekombinanter Antikörperfragmente zum Zweck einer
15 "Affinitätsmaturierung" beschrieben (Low et al., supra; Barbas und Burton, Trends Biotechnol. 14 (1996), 230-234) und lassen sich vom Fachmann auch auf die Anticaline in entsprechender Weise anwenden.

20

Überraschenderweise zeigte sich weiterhin, daß die vier Peptidschleifen, welche die Liganden-Bindungstasche der Lipocaline bilden, hohe Toleranz für Aminosäuresubstitutionen aufweisen, ohne daß die Faltung der Polypeptidkette in den gewonnenen Anticalinen dadurch wesentlich beeinträchtigt wird.

25

Dementsprechend ist es möglich, Anticaline zu generieren, die Bindungstaschen mit vielfältigen Oberflächeneigenschaften aufweisen, so daß die molekulare Erkennung von unterschiedlichsten Liganden, auch von Peptiden oder Polypeptiden sowie anderen Makromolekülen, realisiert werden
30 kann.

35

Ist die genetische Information für ein Anticalin erst einmal vorhanden oder seine Aminosäuresequenz bekannt, so läßt es sich mit allgemein bekannten gentechnischen Verfahren produzieren. Bevorzugt sind Verfahren zur Herstellung von Anticalinen, wobei das Anticalin, ein Fragment des Anticalins oder ein Fusionsprotein aus dem Anticalin und einem anderen

Polypeptid ausgehend von der für das Anticalin kodierenden Nukleinsäure mittels gentechnischer Methoden in einem bakteriellen oder eukaryontischen Wirtsorganismus produziert und aus diesem Wirtsorganismus oder dessen Kultur gewonnen wird. Die Tatsache, daß dabei in der Regel nur ein Strukturgen zur Expression gebracht werden muß, stellt eine erhebliche Vereinfachung im Vergleich zu den Antikörpern oder ihren Fragmenten dar.

10 Eine Vielzahl von Wirtsorganismen, wie *E. coli* und andere Gram-negative oder auch Gram-positive Bakterien, Hefen und andere eukaryontische Zellen, kann zur gentechnischen Herstellung eingesetzt werden. Auch die Wahl zwischen diversen Expressionsstrategien ist möglich. So führt beispielsweise im
15 Wirtsorganismus *E. coli* die Sekretion mit einer geeigneten Signalsequenz, wie in den Beispielen beschrieben, zum korrekt gefalteten, funktionellen Protein, in dem die Disulfidbindungen ausgebildet sind. Andererseits ist es ebenfalls möglich, ein Anticalin im Cytosol einer
20 Bakterienzelle zu produzieren und, falls das Lipocalin im Cytosol nicht funktionell gefaltet wird, dieses erst *in vitro* funktionell zu falten. Selbst eine Faltung aus Aggregaten, welche sich bei der Sekretion ggf. im Periplasma des Bakteriums ansammeln, ist möglich.

25 Gentechnisch hergestellte Anticaline können mittels einer Vielzahl etablierter Methoden gereinigt werden. Die Eignung der Methode hängt jeweils vom verwendeten Wirtsorganismus, der Expressionsstrategie und anderen Faktoren ab, die dem in der
30 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine erfahrenen Fachmann bekannt sind. Die Reinigung kann ggf. vereinfacht werden, indem das Anticalin mit einer oder mehreren Peptidsequenzen fusioniert wird. Bevorzugt sind zur Fusion solche Peptide oder Proteine zu verwenden, die dem
35 resultierenden rekombinanten Protein Affinität zu bestimmten Säulenmaterialien verleihen. Solche Fusionen sollten die Funktion des Anticalins nicht negativ beeinflussen oder müssen

z. B. durch Einfügung geeigneter Proteaseschnittstellen
abspaltbar sein. Als typische Beispiele für Fusionspartner
seien Oligohistidin-Anhängsel, das Strep-Tag oder das Strep-
Tag II, die Glutathion-S-Transferase, das Maltose-
5 Bindungsprotein oder die Albumin-Bindungsdomäne des Protein G
genannt. Ebenso können Anticaline über ihre jeweilige
Liganden-Bindungsstelle mittels einer
Affinitätschromatographie an dem an einer Säulenmatrix
immobilisierten zugehörigen Liganden, bzw. geeigneten
10 Derivaten dieses Liganden, gereinigt werden. Der Aufbau der
Anticaline aus einer einzelnen Polypeptidkette ist im
Vergleich mit rekombinanten Antikörperfragmenten bei der
Reinigung von Vorteil, da keine Maßnahmen ergriffen werden
müssen, um die intakte Assoziation von Untereinheiten zu
15 gewährleisten.

Die Struktur eines Anticalins kann zum Zweck der verbesserten
Produktion, Reinigung oder Anwendbarkeit zusätzlich
modifiziert werden. So kann beispielsweise das N- oder das C-
20 terminale Peptidsegment, welches nicht Bestandteil der β -
Barrel-Struktur ist, entfernt werden. Vorhandene
Disulfidbindungen können durch Substitution der Cysteinreste
eliminiert, oder neue Disulfidbindungen können an anderer
Stelle eingeführt werden. Freie Cysteinreste, wie der Rest 116
25 im ApoD, können entfernt werden, wenn sie z. B. die Produktion
oder die Stabilität des Anticalins beeinträchtigen. Ggf.
können auch Cysteinreste neu eingeführt werden, um z. B.
entsprechende Proteinkonjugate durch chemische Kopplung mit
anderen Komponenten herzustellen. Auch können außerhalb der
30 eigentlichen Ligandenbindungstasche Bindungsstellen für
weitere Liganden, wie z. B. Metallionen, in das Anticalin
eingebaut werden. Schließlich können auch zu anderen Zwecken
als der Proteinproduktion oder -reinigung Fusionsproteine aus
Anticalinen und anderen Polypeptiden, Proteinen oder
35 Proteindomänen mittels dem Fachmann bekannter Methoden
hergestellt werden. Die Fusion kann bevorzugt am N-Terminus
oder auch am C-Terminus des Anticalins erfolgen.

Derartige Fusionen können geeignet sein, um dem Anticalin neue Eigenschaften zu vermitteln, wie z. B. enzymatische Aktivität oder Affinität zu anderen Molekülen, wie Proteinen, Makromolekülen oder niedermolekularen Liganden. Beispielsweise sind Fusionen mit Enzymen, welche chromogene oder fluorogene Reaktionen katalysieren oder zur Freisetzung von cytotoxischen Agenzien dienen können, möglich. Weitere Beispiele für Fusionspartner, die in der Praxis von Vorteil sein können, sind Bindungsdomänen wie die Albumin-Bindungsdomäne von Protein G, Protein A, Antikörperfragmente, Oligomerisierungsdomänen, Toxine oder auch Anticaline mit anderer oder derselben Ligandenspezifität. Alternativ zur Herstellung von Fusionsproteinen können auch Konjugate aus Anticalinen und Proteinen, Nukleinsäuren oder nahezu beliebigen Biomolekülen und chemischen Verbindungen anhand dem Fachmann bekannter Methoden hergestellt werden.

Anticaline und ihre Derivate können ähnlich wie die Antikörper oder deren Fragmente in vielen Bereichen eingesetzt werden. Bevorzugt werden Anticaline verwendet zur Bindung an eine Festphase, so daß der Ligand des Anticalins oder ein Konjugat oder Fusionsprotein dieses Liganden immobilisiert oder abgetrennt werden kann. Weiterhin bevorzugt ist die Verwendung von Anticalinen zur Markierung mit einem Enzym, einem Antikörper, einer radioaktiven Substanz oder einer anderen Gruppe mit einer biochemischen Aktivität oder mit definierten Bindungseigenschaften, so daß der Ligand des Anticalins oder ein Konjugat oder Fusionsprotein dieses Liganden damit nachgewiesen oder in Kontakt gebracht werden kann. Anticaline können beispielsweise zum Nachweis chemischer Strukturen mittels etablierter bioanalytischer Methoden wie ELISA oder Westernblot, in der Mikroskopie oder in der Immunsensorik dienen. Das Nachweissignal kann dabei entweder direkt unter Einsatz eines geeigneten Anticalinkonjugats oder - fusionsproteins erzeugt werden oder indirekt durch Detektion des gebundenen Anticalins mittels eines dagegen gerichteten Antikörpers oder z. B. unter Verwendung eines

Affinitätsanhangsels.

Bevorzugte Liganden für Anticaline sind einerseits chemische Verbindungen in freier oder konjugierter Form, die Merkmale
5 eines immunologischen Haptens aufweisen, und andererseits Peptide, Polypeptide oder andere Makromoleküle wie auch entsprechende Konjugate davon. Ein interessantes Anwendungsgebiet ist der Einsatz der Anticaline zum Zweck des Nachweises von nicht radioaktiv markierten Biomolekülen,
10 insbesondere Nukleinsäuren. So sind zum Beispiel chemisch reaktive Derivate des Fluoresceins zur Markierung von Proteinen oder von Nukleinsäuren kommerziell verfügbar, und auch Verfahren zum Einbau von Fluoresceingruppen bei der Synthese oder Replikation von Nukleinsäuren sind bekannt.
15 Entsprechend modifizierte Nukleinsäuren lassen sich als spezifische Sonden verwenden und anschließend mit den in den Beispielen beschriebenen Anticalinen nachweisen.

Anticaline können auch einen Löschungseffekt auf die
20 Fluoreszenz des von ihnen gebundenen Liganden, wie z. B. Fluorescein, ausüben. Für solche Anticaline ergeben sich vielversprechende Einsatzmöglichkeiten bei biophysikalischen Untersuchungen. So läßt sich der Fluoreszenz-Löschungseffekt eines Anticalins beispielsweise ähnlich wie bei bestimmten
25 Antikörpern gegen Fluorescein ausnutzen, um die Orientierung eines mit Fluorescein markierten Membranproteins in der Lipid-Doppelschicht zu bestimmen. Ein weiterer Anwendungsbereich liegt in der Untersuchung der Dynamik von Ligand/Rezeptor-Wechselwirkungen auf der Zelloberfläche, wobei der Ligand mit
30 einer Fluoresceingruppe markiert ist. Auch vielfältige andere Anwendungen, bei denen die Fluoreszenzlöschung von Fluorescein oder anderen fluoreszierenden Verbindungen eine Rolle spielt, sind möglich. Beispielsweise kann ein Anticalin eingesetzt werden, um eine störende Hintergrundintensität durch
35 überschüssige fluoreszenzmarkierte Reagenzien in der Fluoreszenzmikroskopie von Zellen zu vermeiden.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten für die Anticaline liegen in der Medizin. Neben dem Einsatz in der Diagnostik können auch Anticaline hergestellt werden, welche beispielsweise gewebs- oder tumorspezifische zelluläre Oberflächenmoleküle binden. Entsprechende Anticaline können in konjugierter Form oder als Fusionsproteine zum "Tumor Imaging" oder direkt zur Krebstherapie eingesetzt werden. Zur Herstellung solcher Anticaline kann es zweckmäßig sein, von einem menschlichen Lipocalin auszugehen, wie z. B. dem Rbp oder dem ApoD. Die geringe Größe der Anticaline oder ihrer Derivate hat dabei gegenüber den Antikörpern neue und vorteilhafte Eigenschaften zur Folge.

Die Erfindung wird weiter veranschaulicht durch die nachstehenden Beispiele und die beigefügten Zeichnungen, in denen:

Figur 1 die molekulare Raumstruktur des Bbp mit seinem Liganden Biliverdin IX_γ schematisch darstellt (A) und die räumliche Position derjenigen Aminosäuren angibt (B), die bevorzugt Gegenstand der Mutagenese zur Herstellung von Anticalinen sind;

Figur 2 die Topographie der Polypeptidkette für die Liganden-Bindungsstellen von Antikörpern (A) und von Lipocalinen (B) miteinander vergleicht;

Figur 3 die Aminosäuresequenzen verschiedener Lipocaline gegenüberstellt;

Figur 4 die Herstellung der Bibliothek der Lipocalinmuteine auf der Ebene der Nukleinsäuren schematisch veranschaulicht;

Figur 5 den Phasmidvektor pBBP20 schematisch wiedergibt;

Figur 6 die Expressionsvektoren pBBP21 (A) und pBBP22 (B)

schematisch darstellt;

Figur 7 die Bindung eines Peptids durch Anticaline in einem ELISA demonstriert;

5

Figur 8 die Komplexierung und Fluoreszenzlöschung des Liganden Fluorescein durch ein Anticalin in einer Fluoreszenztitration wiedergibt.

10 Figur 1 zeigt die Kristallstruktur des Bbp (Datei 1BBP aus der Brookhaven Protein Data Bank; Molekül A), die mit Hilfe des Programms MOLSCRIPT (Kraulis, J. Appl. Cryst. 24 (1991), 946-950) graphisch dargestellt wurde. In (A) sind der gebundene Ligand wie auch die beiden Disulfidbindungen in dem Polypeptid
15 als "Ball and Stick" wiedergegeben (Kohlenstoff: schwarz; Stickstoff, Schwefel: dunkelgrau; Sauerstoff: hellgrau). Die einzelnen β -Faltblattstränge sind als Bänder und die α -Helix ist als Spirale abgebildet. Die kelchartige Form der Liganden-Bindungsstelle ist oben am offenen Ende des aus den acht
20 antiparallelen β -Faltblattsträngen gebildeten β -Barrels zu erkennen. In (B) sind die C^α -Positionen der Aminosäuren als entlang der Polypeptidkette miteinander verbundene Kugeln wiedergegeben. Der N- und der C-Terminus des Polypeptids ist markiert. Die schwarz dargestellten C^α -Positionen sind mit den
25 Sequenznummern bezeichnet und geben die Lage der in den Beispielen mutierten Aminosäuren in der Struktur des Bbp an.

Figur 2 zeigt eine Aufsicht (A) auf die Antigen-Bindungsstelle im Fv-Fragment eines Immunglobulins, welche gemeinsam von den
30 variablen Domänen VL und VH gebildet wird, und (B) auf die Liganden-Bindungsstelle eines Lipocalins. Die β -Faltblattstränge sind jeweils angenähert senkrecht zur Papierebene angeordnet und als Balken dargestellt. Die sechs CDRs (L1, L2, L3, H1, H2, H3) im Immunglobulin sowie die vier
35 Peptidschleifen im Lipocalin verbinden jeweils zwei β -Faltblattstränge miteinander. Die anderen Verbindungssegmente und Strukturelemente sind weggelassen.

Figur 3 zeigt einen Sequenzvergleich (Angabe der Aminosäuren im Einbuchstaben-Code) zwischen dem Bilin-Bindungsprotein (SWISS-PROT Datenbank-Zugriffscod P09464), dem menschlichen Apolipoprotein D (SWISS-PROT Datenbank-Zugriffscod P05090) und dem Retinol-Bindungsprotein (SWISS-PROT Datenbank-Zugriffscod P02753) in Form der maturen Polypeptide. Die acht Segmente im Bereich des β -Barrels, welche den konservierten β -Faltblattsträngen entsprechen und in den Kristallstrukturen von Bbp und Rbp große Ähnlichkeit aufweisen, sind durch Unterstreichung hervorgehoben. Die Schleifenregionen, in denen Aminosäuren bevorzugt ausgetauscht werden sollen, sind unterhalb der Sequenz des Bbp durch doppeltes Unterstreichen gekennzeichnet. Diejenigen Positionen im Bbp, welche in den Beispielen mutiert wurden, sind zusätzlich durch Sterne markiert. Das Alignment zwischen den Sequenzen von Bbp und ApoD entspricht derjenigen in der Publikation von Peitsch und Boguski (New Biologist 2 (1990), 197-206).

Figur 4 zeigt schematisch eine Strategie zur konzertierten Mutagenese von 16 ausgewählten Aminosäurepositionen im Bbp durch wiederholte Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Für jede der vier Peptidschleifen des Lipocalins, in der Aminosäuren mutiert werden sollten, wurde ein Oligodesoxynukleotid synthetisiert, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 und SEQ ID NO:4, wobei an den Mutationsstellen jeweils die im Sequenzprotokoll angegebenen Mischungen der Basenbausteine eingesetzt wurden. Aufgrund der gewählten Zusammensetzung konnte an allen mutierten Codons aus den drei insgesamt möglichen Stopcodons ggf. nur das Amber-Stopcodon, TAG, entstehen, welches in den zur Genexpression verwendeten *E. coli supE*-Stämmen XL1-Blue oder TG1 als Glutamin translatiert wird. Für bestimmte Anwendungen, beispielsweise zur Genexpression in anderen Bakterienstämmen oder Organismen, kann ein solches Nonsense-Codon, wenn es im Strukturgenen für ein selektiertes Anticalin auftritt, vom Fachmann z. B. mittels ortsgerichteter Mutagenese durch ein für Glutamin kodierendes Codon substituiert werden. Mit den Primern SEQ ID

NO:1 und SEQ ID NO:2 wurde unter Verwendung der pBBP20-Plasmid-DNA (SEQ ID NO:10), die das Bbp-Strukturgen enthält, als Matrize ein Nukleinsäurefragment mit 159 Basenpaaren amplifiziert (1. Schritt, A). Parallel dazu wurde mit den
5 Primern SEQ ID NO:3 und SEQ ID NO:4, ebenfalls unter Verwendung von pBBP20 als Matrize, ein Nukleinsäurefragment mit 164 Basenpaaren amplifiziert (1. Schritt, B). Die Mischung dieser beiden Fragmente diente als Matrize in einem 2. Amplifizierungsschritt in Gegenwart eines mit den beiden
10 Fragmenten hybridisierenden Oligodesoxynukleotids SEQ ID NO:5 sowie der beiden flankierenden PCR-Primer SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:7, wobei ein Genfragment von 371 Basenpaaren erhalten wurde. Dieses enthielt alle 16 mutierten Codons und wurde anschließend mittels der beiden *Bst*XI-Schnittstellen in dem
15 Vektor pBBP20 kloniert. Die Verwendung dieser beiden Restriktionsschnittstellen, die durch ihre spezielle Anordnung beim Restriktionsverdau zu zwei nicht kompatiblen überhängenden DNA-Enden führten, ermöglichte eine besonders effiziente Ligierung. Zur Einführung der beiden *Bst*XI-
20 Schnittstellen in das Bbp-Strukturgen waren zuvor die beiden Aminosäuresubstitutionen Asn21 zu Gln und Lys135 zu Met gegenüber der ursprünglichen Sequenz vorgenommen worden.

Figur 5 zeigt eine Zeichnung von pBBP20. Dieser Vektor kodiert
25 für ein Fusionsprotein aus der *OmpA*-Signalsequenz, einem veränderten Bbp mit den vier Aminosäuresubstitutionen Asn1 zu Asp, Asn21 zu Gln, Lys87 zu Ser und Lys135 zu Met, dem Strep-Tag II-Affinitätsanhängsel und einer verkürzten Form des Hüllproteins pIII von M13, umfassend die Aminosäuren 217 bis
30 406 (pIII). Das Strukturgen steht unter der Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators (*tetP/O*) und endet am Lipoprotein-Transkriptionsterminator (*tlpp*). Weitere Elemente des Vektors sind der Replikationsursprung (*ori*), die intergenische Region des filamentösen Bakteriophagen f1 (*f1-IG*), das für die β -Lactamase kodierende Ampicillin-Resistenzgen (*bla*) und das Tetracyclin-Repressorgen (*tetR*). Zwischen der kodierenden Region für das
35

Bbp mit der OmpA-Signalsequenz und dem Strep-Tag II sowie der kodierenden Region für das verkürzte Phagenhüllprotein pIII befindet sich ein Amber-Stopcodon, welches in einem Amber-Suppressor-Wirtsstamm teilweise überlesen wird. Die beiden
5 BstXI-Schnittstellen, die zur Klonierung der mutierten Genkassette verwendet wurden, und die das Strukturgen flankierenden Restriktionsschnittstellen sind markiert. Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP20 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll
10 als SEQ ID NO:10 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit einer Hexanukleotidsequenz, die durch Ligierung eines XbaI-Überhangs mit einem dazu komplementären SpeI-Überhang erhalten wurde, und endet mit der HindIII-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit
15 dem Vektor pASK75, dessen vollständige Nukleotidsequenz in der Offenlegungsschrift DE 44 17 598 A1 angegeben ist.

Figur 6 zeigt eine Zeichnung von pBBP21 (A) und von pBBP22 (B). pBBP21 kodiert für ein Fusionsprotein aus der OmpA-Signalsequenz, einem veränderten Bbp gemäß Figur 5 und dem
20 Strep-Tag II-Affinitätsanhängsel. Dieses Strukturgen wird von dem dsbC-Strukturgen (einschließlich dessen ribosomaler Bindungsstelle) aus *E. coli* (Zapun et al., Biochemistry 34 (1995), 5075-5089) als einem zweiten Cistron gefolgt. Das
25 dadurch gebildete künstliche Operon steht unter gemeinsamer Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators (tetP/o) und endet am Lipoprotein-Transkriptionsterminator (tlpp). Alle weiteren genetischen Elemente sind identisch mit pBBP20 gemäß Figur 5. Die mit der Kosekretion verbundene
30 Überproduktion der bakteriellen Disulfidisomerase DsbC kann die Knüpfung der richtigen Disulfidbrücken in dem Lipocalin unterstützen und so die Ausbeute an korrekt gefaltetem Polypeptid steigern. Allerdings ist die Produktion des Lipocalins oder der Anticaline auch ohne diese Maßnahme
35 möglich. Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP21 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:11 wiedergegeben. Der

Ausschnitt beginnt mit der *Xba*I-Schnittstelle und endet mit einem Hexanukleotid, das durch Ligierung eines stumpfen Strangendes mit einem aufgefüllten *Hind*III-Strangende erhalten wurde, wobei die ursprüngliche *Hind*III-Schnittstelle verloren ging. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pASK75, dessen vollständige Nukleotidsequenz in der Offenlegungsschrift DE 44 17 598 A1 angegeben ist. pBBP22 kodiert für ein Fusionsprotein aus der *OmpA*-Signalsequenz, einem veränderten Bbp gemäß Figur 5, dem Strep-Tag II-Affinitätsankhängsel und einer Albumin-Bindungsdomäne (abd) des Protein G aus *Streptococcus* (Kraulis et al., FEBS Lett. 378 (1996), 190-194). Alle weiteren genetischen Elemente sind identisch mit pBBP20. Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP22 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:12 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der *Xba*I-Schnittstelle und endet mit der *Hind*III-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pASK75, dessen vollständige Nukleotidsequenz in der Offenlegungsschrift DE 44 17 598 A1 angegeben ist.

Figur 7 zeigt eine graphische Darstellung der Daten aus Beispiel 7, in der ein synthetisiertes Peptidpitop des Hepatitis C-Virus mit den Anticalinen HepC1 (Quadrate) und HepC4 (Kreise) in einem ELISA nachgewiesen wurde. Zum Vergleich sind die mit dem Bbp (Dreiecke) erhaltenen Werte aufgetragen. "C" steht für die relative Proteinkonzentration innerhalb jeder Verdünnungsreihe.

Figur 8 zeigt eine graphische Darstellung der Daten aus Beispiel 8, bei der eine 1 μ M Lösung von Fluorescein mit unterschiedlichen Konzentrationen des Anticalins FluA versetzt wurde. Die Fluoreszenzintensitäten wurden bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 512 nm gemessen und gegen die jeweilige Gesamtkonzentration des Anticalins im Ansatz aufgetragen. Die Datenpunkte wurden schließlich durch eine Ausgleichskurve angepaßt.

BeispieleBeispiel 1: Herstellung einer Bibliothek für Lipocalinmureine

- 5 Sofern nicht anders angegeben, wurden die dem Fachmann
geläufigen gentechnischen Methoden, wie sie z. B. in Sambrook
et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989), Cold
Spring Harbor Press) beschrieben sind, verwendet.
- 10 Zur konzertierten Mutagenese von insgesamt 16 ausgewählten
Aminosäurepositionen in den vier Peptidschleifen des Bbp wurde
die PCR in mehreren Schritten gemäß Figur 4 angewandt. Die
PCR-Reaktionen wurden in den ersten beiden
15 Amplifizierungsschritten in einem Volumen von 50 µl
durchgeführt, wobei 10 ng pBBP20-Plasmid-DNA als Matrize sowie
jeweils 25 pmol der Primer, welche nach der üblichen
Phosphoramidit-Methode synthetisiert worden waren, eingesetzt
wurden. Zudem enthielt der Reaktionsansatz 5 µl 10xTaq-Puffer
20 (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl, 1 % v/v Triton X-100), 3
µl 25 mM MgCl₂, 4 µl dNTP-Mix (2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP).
Nach Auffüllen mit Wasser wurde der Ansatz mit Mineralöl
überschichtet und in einem programmierbaren
Thermostatisierblock für 2 min auf 94 °C erhitzt. Anschließend
wurden 2,5 u Taq DNA-Polymerase (5 u/µl, Promega) zugegeben
25 und 20 Temperaturzyklen von 1 min bei 94 °C, 1 min bei 60 °C,
1,5 min bei 72 °C, gefolgt von einer Inkubation für 5 min bei
60 °C, durchgeführt. Die gewünschten Amplifizierungsprodukte
wurden durch präparative Agarose-Gelelektrophorese unter
Verwendung des Jetsorb DNA Extraction Kits (Genomed) nach den
30 Angaben des Herstellers aus Low Melting Point Agarose (Gibco
BRL) isoliert.
- Der darauffolgende Amplifizierungsschritt wurde in einem 100
µl-Ansatz durchgeführt, wobei jeweils ca. 6 ng dieser beiden
35 Fragmente als Matrize, je 50 pmol der beiden Primer SEQ ID
NO:6 und SEQ ID NO:7 sowie 1 pmol des Oligodesoxynukleotids
SEQ ID NO:5 eingesetzt wurden. Die restlichen Komponenten des

PCR-Ansatzes wurden wie in den vorangegangenen Amplifizierungsschritten mit der doppelten Menge zugesetzt. Die PCR fand bei 20 Temperaturzyklen von 1 min bei 94 °C, 1 min bei 55 °C, 1,5 min bei 72 °C statt, gefolgt von einer
5 abschließenden Inkubation für 5 min bei 60 °C. Das erwartete Fragment wurde erneut durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert.

Zur Klonierung dieses Fragments, welches die Bibliothek der
10 Lipocalinmteine in Form der Nukleinsäure repräsentierte, wurde es zunächst mit dem Restriktionsenzym BstXI (New England Biolabs) nach den Angaben des Herstellers geschnitten. Die Reinigung des erhaltenen Nukleinsäurefragments (335 Basenpaare, bp) erfolgte wiederum mittels präparativer
15 Agarose-Gelelektrophorese. Analog wurde die DNA des Vektors pBBP20 mit BstXI geschnitten und das größere der beiden Fragmente (3971 bp) isoliert.

Zur Ligierung wurden 0,93 µg (4,2 pmol) des PCR-Fragments und
20 11 µg (4,2 pmol) des Vektorfragments in Gegenwart von 102 Weiss Units T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) in einem Gesamtvolumen von 500 µl (50 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 50 µg/ml BSA) für zwei Tage bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA gefällt, indem jeweils
25 24 µl des Ligierungsansatzes mit 10 µg tRNA aus Hefe (Boehringer Mannheim), 25 µl 5 M Ammoniumacetat und 100 µl Ethanol versetzt wurden. Nach Inkubation bei -20 °C für drei Tage wurde zentrifugiert (25 min, 16000 g, 4 °C). Das Präzipitat wurde mit jeweils 200 µl Ethanol (70 % v/v, -20 °C)
30 gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Die DNA wurde schließlich in 43,6 µl TE/10 (1 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA pH 8,0) aufgenommen. Die DNA-Konzentration der erhaltenen Lösung wurde durch analytische Agarose-Gelelektrophorese anhand der Fluoreszenzintensität der mit Ethidiumbromid
35 angefärbten Banden im Vergleich mit einer Probe bekannter Konzentration abgeschätzt.

Die Präparation elektrokompeter Zellen des *E. coli* K12-Stamms XL1-Blue (Bullock et al., supra) erfolgte gemäß den von Tung und Chow (Trends Genet. 11 (1995), 128-129) und von Hengen (Trends Biochem. Sci. 21 (1996), 75-76) beschriebenen Methoden. 1 l LB-Medium wurde durch Zugabe einer stationären XL1-Blue Übernachtskultur auf eine optische Dichte bei 600 nm, OD₆₀₀ = 0,08 eingestellt und bei 200 Upm und 26 °C in einem 2 l-Erlenmeyer-Kolben inkubiert. Nach Erreichen von OD₆₀₀ = 0,6 wurde die Kultur für 30 min auf Eis gekühlt und anschließend für 15 min bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde zweimal mit jeweils 500 ml eiskaltem 10 % w/v Glycerin gewaschen und schließlich in 2 ml eiskaltem GYT-Medium (10 % w/v Glycerin, 0,125 % w/v Hefeextrakt, 0,25 % w/v Trypton) resuspendiert.

Zur Elektroporation wurde das Easyjec T Basic System (EquiBio) mit den dazugehörigen Küvetten (Elektrodenabstand 2 mm) verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Jeweils 5 bis 6 µl der oben genannten DNA-Lösung (245 ng/µl) wurde mit 40 µl der Zellsuspension gemischt, 1 min auf Eis inkubiert und anschließend in die Küvette überführt. Nach der Elektroporation wurde die Suspension sofort in 2 ml frischem, eiskaltem SOC-Medium (2 % w/v Trypton, 0,5 % w/v Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂) verdünnt und für 60 min bei 37 °C und 200 Upm geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend jeweils für 2 min bei 3600 g sedimentiert, in 1 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (LB/Amp) resuspendiert und zu je 200 µl auf Agar-Platten (140 mm Durchmesser) mit LB/Amp-Medium ausplattiert. Unter Einsatz von insgesamt 10,7 µg der ligierten DNA wurden auf diese Weise mit acht Elektroporationsansätzen $3,73 \cdot 10^8$ Transformanten erhalten, die auf 40 Agar-Platten verteilt waren und gemäß Beispiel 2 weiter verwendet wurden.

Beispiel 2: Phagemidpräsentation und Selektion von Anticalinen gegen Fluorescein

Die auf LB/Amp-Agar ausplattierten Zellen, welche mit den Phasmidvektoren transformiert waren, die für die Bibliothek der Lipocalinmureine als Fusionsproteine kodierte, wurden für 14 h bei 32 °C inkubiert. Dann wurden die Kolonien unter
5 Zusatz von je 10 ml 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt, in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und zur vollständigen Resuspendierung für 20 min bei 37 °C, 200 Upm geschüttelt. 500 ml auf 37 °C vorgewärmtes 2xYT/Amp-Medium wurden mit 2,3 ml dieser Suspension inokuliert, so daß die
10 Zelldichte OD₅₅₀ bei 0,08 lag.

Diese Kultur wurde bei 37 °C, 160 Upm bis zu einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 0,5 inkubiert, mit VCS-M13 Helferphage (Stratagene) infiziert (Multiplicity of Infection ca. 10) und
15 für weitere 30 min bei 37 °C, 160 Upm geschüttelt. Anschließend wurde Kanamycin (70 µg/ml) zugegeben, die Inkubortemperatur auf 26 °C erniedrigt und nach 10 min mit 25 µg/l Anhydrotetracyclin (250 µl einer 50 µg/ml-Stammlösung in Dimethylformamid, DMF) zur Induktion der Genexpression
20 versetzt. Anschließend wurde für weitere 7 h bei 26 °C, 160 Upm inkubiert.

50 ml wurden aus dieser Kultur entnommen und die Zellen durch Zentrifugation (15 min, 12000 g, 4 °C) sedimentiert. Der
25 Überstand, der die Phagemidpartikel enthielt, wurde sterilfiltriert (0,45 µm), mit 1/4 Volumen (12,5 ml) 20 % w/v PEG 8000, 15 % w/v NaCl versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min, 18000 g, 4 °C) wurden die präzipitierten Phagemidpartikel in 2 ml kaltem PBS (4 mM
30 KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7,4) gelöst. Die Lösung wurde für 30 min auf Eis inkubiert und auf zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt. Nach Abzentrifugieren ungelöster Bestandteile (5 min, 18500 g, 4 °C) wurde der Überstand jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

35

Zur erneuten Fällung der Phagemidpartikel wurde mit 1/4 Volumen 20 % w/v PEG 8000, 15 % w/v NaCl gemischt und für 30

bis 60 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min, 18500 g, 4 °C) wurde der Überstand entfernt und die präzipitierten Phagemidpartikel in insgesamt 1 ml PBS gelöst. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurde die Lösung
5 zentrifugiert (5 min, 18500 g, 4 °C) und der Überstand mit den Phagemidpartikeln direkt für die Affinitätsanreicherung eingesetzt.

10 Zur Affinitätsanreicherung der die Anticalin-Fusionsproteine tragenden rekombinanten Phagemide wurden Immuno-Sticks (NUNC) verwendet. Diese wurden über Nacht mit 800 µl eines Konjugats aus Rinderserum-Albumin (BSA) und 4-Glutaryl-amido-fluorescein (100 µg/ml) in PBS beschichtet.

15 Zur Herstellung des Konjugats wurde 4-Amino-fluorescein (Fluoresceinamin Isomer I, Fluka) zunächst mit einem fünfzehnfachen molaren Überschuß an Glutarsäureanhydrid bei pH 7,0 gemäß der Arbeitsvorschrift von Ogano et al. (Carbohydrate Res. 105 (1982), 69-85) umgesetzt, um später die sterische
20 Zugänglichkeit der Fluoresceingruppe zu gewährleisten. Das Reaktionsprodukt 4-Glutaryl-amido-fluorescein, welches eine zur Kopplung mit dem BSA geeignete Carbonsäuregruppe an einer aliphatischen Seitenkette trug, wurde anschließend durch Umkristallisieren aus Aceton/Wasser gereinigt. Eine Lösung von
25 17,3 mg (37,5 µmol) dieser Substanz in 25 µl DMF wurde dann zur Aktivierung mit 4,31 mg (37,5 µmol) N-Hydroxysuccinimid in 25 µl DMF sowie mit 7,2 mg (37,5 µmol) 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid versetzt. Der Ansatz wurde für
30 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. 20 µl dieser Lösung wurden mit einer Lösung von 10 mg BSA in 980 µl 5 % w/v NaHCO₃ pH 8,1 versetzt und für 3 h bei RT inkubiert. Nach Abtrennung der überschüssigen Reaktanden von dem BSA-Konjugat mittels einer PD-10 Gelfiltrationssäule (Pharmacia) wurde eine
35 Beladung von 8 Molekülen 4-Glutaryl-amido-fluorescein pro BSA-Molekül anhand der Absorption der Fluoresceingruppe bei 495 nm ($\epsilon = 72000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bestimmt.

Unbelegte Bindungsstellen auf der Oberfläche des Immuno-Sticks wurden durch Inkubation mit 1,2 ml 2 % w/v BSA in PBST (PBS mit 0,1 % v/v Tween 20) für 2 h bei RT abgesättigt. Nach dreimaligem kurzen Waschen mit jeweils 1,2 ml PBST wurde der
5 Immuno-Stick in einer Mischung aus 250 µl der Phagemidlösung und 500 µl Blockierungspuffer (2 % w/v BSA in PBST) für 1 h bei RT inkubiert.

10 Zur Entfernung nicht gebundener Phagemide wurde achtmal (bei der ersten Selektion) bzw. zehnmal (bei den Selektionszyklen 2 bis 6) mit jeweils 950 µl PBST für 2 min gewaschen. Adsorbierte Phagemide wurden schließlich durch 10minütige Behandlung des Immuno-Sticks mit 950 µl 0,1 M Glycin/HCl pH 2,2 eluiert, wobei der pH der Elutionsfraktion sofort
15 anschließend durch Mischen mit 160 µl 0,5 M Tris neutralisiert wurde.

Zur Amplifizierung wurde diese Phagemidlösung (1,1 ml, je nach Selektionszyklus zwischen 10^6 und 10^8 Colony-forming Units) kurz auf 37 °C erwärmt, mit 4 ml einer exponentiell wachsenden Kultur von *E. coli* XL1-Blue (OD₅₅₀ = 0,5) gemischt und für 30 min bei 37 °C, 200 Upm inkubiert. Die mit den Phagemiden infizierten Zellen wurden anschließend sedimentiert (2 min, 4420 g, 4 °C), in 800 µl des Kulturmediums resuspendiert und
25 auf vier Agar-Platten mit LB/Amp-Medium (140 mm Durchmesser) ausplattiert.

Zur wiederholten Produktion und Affinitätsanreicherung von Phagemidpartikeln wurde verfahren, wie zu Beginn dieses
30 Beispiels beschrieben. In diesen Fällen wurde mit 0,2 bis 1 ml der Suspension der auf den Agar-Platten gewachsenen Zellen jeweils 50 ml 2xYT/Amp-Medium angeimpft. Auf diese Weise wurden fünf weitere Selektionszyklen mit dem BSA-Fluoresceinkonjugat durchgeführt.

35

Beispiel 3: Produktion der Anticaline

Zur präparativen Produktion der Anticaline wurde die Genkassette zwischen den beiden *Bst*XI-Schnittstellen aus dem pBBP20-Vektor in das Expressionsplasmid pBBP21 subkloniert. Als Kontrolle wurde das auf pBBP21 ursprünglich kodierte Bbp ebenfalls produziert.

Zur Subklonierung wurde aus der Mischung der *E.coli*-Zellen aus Beispiel 2, die mit den Phagemiden des letzten Selektionszyklus infiziert waren, die Phasmid-DNA unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (QIAGEN) isoliert. Diese wurde mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI geschnitten und das kleinere der beiden Fragmente (335 bp) durch präparative Agarose-Gelelektrophorese wie in Beispiel 1 beschrieben gereinigt. In gleicher Weise wurde die DNA des Vektors pBBP21 mit *Bst*XI geschnitten und das größere der beiden Fragmente (4132 bp) isoliert.

Zur Ligierung wurden jeweils 50 fmol der beiden DNA-Fragmente in einem Gesamtvolumen von 20 µl (30 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP) mit 1,5 Weiss Units T4 DNA Ligase (Promega) versetzt und 5 h bei 16 °C inkubiert. Mit 5 µl dieses Ligierungsansatzes wurde dann *E.coli*-TG1-F⁻ (*E. coli* K12 TG1, der durch wiederholte Kultivierung unter nicht selektiven Bedingungen sein Episom verloren hatte) nach der CaCl₂-Methode transformiert (Sambrook et al., supra).

Aus zehn der erhaltenen Kolonien wurde die Plasmid-DNA isoliert und die Ligierung durch Restriktionsanalyse mit den Enzymen *Hind*III und *Kpn*I kontrolliert. Alle zehn Plasmide zeigten die erwarteten Fragmentgrößen von 342 und 4125 bp.

Die Sequenzanalyse der Bbp-Genkassetten erfolgte mit Hilfe des T7 Sequencing Kits (Pharmacia) nach Herstellerangaben unter Verwendung der Oligodesoxynukleotide SEQ ID NO:8 und SEQ ID NO:9. Dabei wurden unter den zehn isolierten Plasmiden nur vier verschiedene Sequenzen gefunden, deren Genprodukte als FluA, FluB, FluC und FluD bezeichnet wurden. Die DNA-Sequenz

von FluA war zweimal, von FluB viermal, von FluC dreimal und von FluD einmal vertreten. Die Nukleotidsequenzen von FluA, FluB und FluC wurden in Aminosäuresequenzen übersetzt, und die vom Bbp abweichenden Aminosäuren sind in Tabelle 1
5 wiedergegeben.

Zur Untersuchung der Bindungsaktivität der Anticaline in einem ELISA (Beispiel 4) wurde die Proteinproduktion der entsprechenden Klonen im 50 ml-Maßstab durchgeführt. Dazu
10 wurden jeweils 4 ml LB/Amp-Medium mit einer Einzelkolonie des TG1-F⁻-Transformanten, der das jeweilige Plasmid trug, angeimpft und über Nacht bei 30 °C, 200 Upm inkubiert. 500 µl dieser Vorkultur wurden dann jeweils auf 50 ml LB/Amp-Medium überimpft und bei 22 °C, 200 Upm bis zu einer OD₅₅₀ = 0,5
15 geschüttelt. Anschließend wurde mit 200 µg/l Anhydrotetracyclin (50 µl einer 200 µg/ml-Stammlösung in DMF) induziert und weitere 3 h bei 22 °C, 200 Upm geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (15 min, 4420 g, 4 °C) sedimentiert und jeweils in 1 ml kaltem Periplasma-
20 Aufschlußpuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe von 25 µl einer Lösung von 1 mg/ml Lysozym in dem Periplasma-Aufschlußpuffer wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Die Sphäroplasten wurden durch
25 Zentrifugation (15 min, 18500 g, 4 °C) sedimentiert, und der Überstand wurde als periplasmatischer Proteinextrakt in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur Proteinproduktion im größeren Maßstab wurde eine 50 ml-Vorkultur (LB/Amp-Medium) direkt mit einer Einzelkolonie des
30 mit dem entsprechenden Plasmid transformierten TG1-F⁻-Stamms angeimpft und bei 30 °C, 200 Upm über Nacht geschüttelt. Im Fall der Anticaline FluA und FluB wurde der *E. coli*-Stamm JM83 (Yanisch-Perron et al., Gene 33 (1985), 103-119), der kein *supE*-Gen trägt, verwendet. Die gesamte Vorkultur wurde auf 2 l
35 LB/Amp-Medium in einem 5 l-Erlenmeyerkolben überimpft, woraufhin die Kultur bei 22 °C, 200 Upm inkubiert wurde. Bei einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 0,5 wurde mit 200 µg/l

Anhydrotetracyclin (200 μ l einer 2 mg/ml-Stammlösung in DMF) induziert und für weitere 3 h bei 22 °C, 200 Upm geschüttelt.

Die Zellen wurden abzentrifugiert (15 min, 4420 g, 4 °C) und
5 nach Entfernung des Überstands unter Kühlung auf Eis in 20 ml
des Periplasma-Aufschlußpuffers resuspendiert. Nach Zugabe von
50 μ g/ml Lysozym (100 μ l einer Lösung von 10 mg/ml Lysozym in
dem Periplasma-Aufschlußpuffer) wurde für 30 min auf Eis
10 inkubiert. Anschließend wurden die Sphäroplasten in zwei
aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten abgetrennt (15
min, 4420 g, 4 °C und 15 min, 30000 g, 4 °C). Der so gewonnene
periplasmatische Proteinextrakt wurde gegen CP-Puffer (100 mM
Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) dialysiert,
sterilfiltriert und zur chromatographischen Reinigung
15 eingesetzt.

Die Reinigung erfolgte mittels des an den C-Terminus der
Lipocalinmteine fusionierten Strep-Tag II-
Affinitätsanhangsels (Schmidt et al., supra). Im vorliegenden
20 Fall wurde das Streptavidinmteine "1" eingesetzt (Deutsche
Patentanmeldung 196 41 876.3; Voss und Skerra, Protein Eng. 10
(1997), 975-982), welches an eine aktivierte Sepharose (5
mg/ml immobilisiertes Streptavidin, bezogen auf das
Bettvolumen der Matrix) gekoppelt war.
25 Eine mit diesem Material befüllte Chromatographiesäule mit 2
ml Bettvolumen wurde bei 4 °C und einer Flußrate von 20 ml/h
mit 10 ml CP-Puffer äquilibriert. Die Chromatographie wurde
durch Messung der Absorption bei 280 nm des Eluats in einem
Durchfluß-Photometer verfolgt. Nach dem Auftragen des
30 periplasmatischen Proteinextrakts wurde bis zum Erreichen der
Basislinie mit CP-Puffer gewaschen und das gebundene Anticalin
anschließend mit 10 ml einer Lösung von 2,5 mM D-Desthiobiotin
(Sigma) in CP-Puffer eluiert. Die Fraktionen, die das
gereinigte Anticalin enthielten, wurden mittels der SDS-
35 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Fling und Gregerson, Anal.
Biochem. 155 (1986), 83-88) überprüft und vereinigt. Die
Proteinausbeuten lagen zwischen 200 μ g und 3 mg je 2 l Kultur.

Tabelle 1: Sequenzcharakteristika selektierter Anticaline

	Aminosäure- Position	Bbp	FluA	FluB	FluC	HepC1	HepC4
5	34	Asn	Ser	Gln	Ser	Lys	Gln ^a
	35	Ser	Pro	His	Lys	Thr	Ala
	36	Val	Asn	Trp	Asn	Lys	Pro
	37	Glu	Gly	Asp	Gly	Gln ^a	Gly
	58	Asn	Arg	Arg	Arg	Leu	Pro
10	60	His	Asp	Arg	Thr	His	Asn
	69	Ile	Met	His	Gln ^a	Phe	Ala
	88	Leu	Arg	Val	Arg	Val	Trp
	90	Tyr	Val	Arg	Val	Ala	Gly
	93	Val	Tyr	Arg	Lys	Phe	Leu
15	95	Lys	Arg	Arg	Arg	Ser	Ala
	97	Asn	Thr	Gly	Gly	Gln	Trp
	114	Tyr	Ser	Arg	Arg	Ala	Pro
	116	Lys	Arg	Arg	Arg	Tyr	Arg
	125	Gln	Trp	Trp	Leu	Val	Leu
20	127	Phe	His	His	His	Phe	Pro
	40 ^b	Gly			Arg	Glu	
	68 ^b	Phe			Val		
	70 ^b	Glu		Lys			
	96 ^b	Glu	Lys				
25	100 ^b	Asn				Ser	

^aDiese Glutaminsäurereste wurden von Amber-Stopcodons kodiert.

^bDiese Aminosäuresubstitutionen traten aufgrund zufälliger Mutationen auf.

30

Beispiel 4: Ermittlung der Affinität der Anticaline für Fluorescein und dessen Derivate

Für den Bindungsnachweis im ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent
35 Assay) wurden zunächst die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte
(Micro Test III Flexible Assay Plate; Falcon) mit je 100 µl
einer 100 µg/ml-Lösung des BSA-Fluorescein-Konjugats aus

- Beispiel 2 in PBS gefüllt und über Nacht bei RT inkubiert. Als Kontrolle diente nicht konjugiertes BSA. Die Lösung wurde entfernt und unbelegte Bindungsstellen wurden mit 200 μ l 2 % w/v BSA in PBST für 2 h abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurden 100 μ l des periplasmatischen Proteinextrakts aus der Produktion im 50 ml-Maßstab (Beispiel 3) in die Vertiefungen gefüllt. Ausgehend von diesen Proteinlösungen wurden Verdünnungsreihen in PBST hergestellt. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde erneut dreimal mit PBST gewaschen und ein Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Amersham), 1:1000 mit PBST verdünnt, in die Vertiefungen gefüllt. Dieses Enzymkonjugat diente zur Erkennung des Strep-Tag II-Anhängsels am C-Terminus der Anticaline. Es wurde für 1 h bei RT inkubiert und anschließend zweimal mit PBST und zweimal mit PBS gewaschen. Der Nachweis der an die Fluoresceingruppen gebundenen Anticaline erfolgte schließlich mittels der durch die Alkalische Phosphatase katalysierten Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat. Dazu wurden 100 μ l einer Lösung von 0,5 mg/ml p-Nitrophenylphosphat (Amresco) in AP-Puffer (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris/HCl pH 8,8) in die Vertiefungen gefüllt und die Produktbildung durch Messung der Absorption bei 405 nm in einem SpectraMax 250-Photometer (Molecular Devices) verfolgt.
- Hierbei ließ sich praktisch keine Bindung für FluD und das Bbp nachweisen, während FluA, FluB und FluC intensive Bindungssignale zeigten. Das Signal war in der Relation für FluC am stärksten, gefolgt von FluA und FluB.
- Die Liganden-Bindungseigenschaften der Anticaline wurden daraufhin mittels der Methode der Fluoreszenztitration bestimmt. Gemessen wurde dabei die Abnahme der intrinsischen Tyrosin- und Tryptophan-Fluoreszenz des Proteins bei Komplexbildung mit dem Liganden. Die Messungen erfolgten mit einem Fluoreszenzphotometer (MS III, Photon Technology International Inc.) bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm (Spaltbreite 5 nm) und einer Emissionswellenlänge von 340 nm

(Spaltbreite 10 nm). Als Liganden wurden Fluorescein, 4-Amino-fluorescein sowie dessen Konjugat mit Glutarsäure aus Beispiel 2 eingesetzt. Diese drei Liganden zeigten bei den angegebenen Wellenlängen keine signifikante Eigenfluoreszenz.

- 5 Als Puffersystem diente PBS unter Zusatz von 1 mM EDTA mit pH 7,4 (mit NaOH eingestellt). Alle verwendeten Lösungen wurden sterilfiltriert (0,45 μ m). Die Lösung des jeweiligen gereinigten Anticalins aus Beispiel 3 wurde dreimal gegen
10 diesen Puffer dialysiert und durch Verdünnen auf eine Konzentration von 1 μ M eingestellt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels der Absorption bei 280 nm unter Verwendung kalkulatorischer Extinktionskoeffizienten von 63680 M⁻¹ cm⁻¹ für FluB sowie
15 52300 M⁻¹ cm⁻¹ für FluC. Für FluA und Bbp wurden die nach Gill und von Hippel (Anal. Biochem. 182 (1989), 319-326) in Gegenwart von Guanidiniumchlorid korrigierten kalkulatorischen Extinktionskoeffizienten von 59755 M⁻¹ cm⁻¹ (FluA) sowie 54150 M⁻¹ cm⁻¹ (Bbp) verwendet.
- 20 Zur Messung wurde 2 ml der Anticalinlösung in einer Quarzküvette, die mit einem Rührfisch ausgestattet war, vorgelegt und im Probenhalter des Photometers auf 25 °C temperiert. Anschließend wurden insgesamt 40 μ l einer 250 μ M
25 bis 1 mM Lösung des Liganden in demselben Puffer in Schritten von 1 μ l bis 4 μ l zupipettiert. Die dabei stattfindende Verdünnung der vorgelegten Proteinlösung um maximal 2 % blieb bei der nachfolgenden Auswertung der Daten unberücksichtigt. Nach jedem Titrationsschritt wurde zur
30 Gleichgewichtseinstellung für 1 min unter Rühren inkubiert und das Fluoreszenzsignal als Mittelwert über 10 s gemessen. Nach Abzug des Fluoreszenzwertes für den Puffer wurden die Signale auf einen Anfangswert von 100 % normiert und um den inneren Filtereffekt der Liganden korrigiert. Dazu wurden
35 Fluoreszenztitrationen mit dem jeweiligen Ligand durchgeführt, bei denen die Anticalin-Lösung durch N-Acetyl-L-tryptophanamid (Sigma) ersetzt war.

Die so erhaltenen Meßwerte einer Titrationsreihe wurden gemäß folgender Formel durch nicht-lineare Regression mit Hilfe des Computerprogramms Kaleidagraph (Abelbeck Software) angepaßt:

$$F = ([P]_t - [L]_t - K_d) \frac{f_P}{2} + ([P]_t + [L]_t + K_d) \frac{f_{PL}}{2} + (f_P - f_{PL}) \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_d)^2}{4} - [P]_t [L]_t}$$

Dabei bedeuten F die normierte Fluoreszenzintensität und $[P]_t$ die Konzentration des Anticalins. $[L]_t$ ist die Gesamtkonzentration des Liganden bei dem jeweiligen Titrationsschritt. f_{PL} und K_d wurden als freie Parameter an die gemessenen Daten angepaßt und stehen für den Fluoreszenzkoeffizienten des Anticalin-Ligandkomplexes sowie für die thermodynamische Dissoziationskonstante dieses Komplexes. Im Fall von FluC wurde zusätzlich $[P]_t$ als freier Parameter angepaßt. Die ermittelten Dissoziationskonstanten für die Anticaline FluA, FluB und FluC sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Der Bindungseffekt bei der Vergleichsmessung mit Bbp war so schwach, daß eine Dissoziationskonstante in diesem Fall nicht bestimmt werden konnte.

Tabelle 2: Dissoziationskonstanten für die Komplexe aus Anticalinen und Fluoresceinderivaten

	Fluorescein	4-Aminofluorescein	4-Glutarylaminodifluorescein
FluA	118 ± 14 nM	224 ± 6 nM	601 ± 16 nM
FluB	5,73 ± 0,86 µM	2,84 ± 0,3 µM	4,70 ± 0,51 µM
FluC	411 ± 20 nM	299 ± 41 nM	78 ± 3 nM

Beispiel 5: Selektion von Anticalinen gegen ein Hepatitis C-Peptidpitop

Zur Selektion der Anticaline wurde die in Beispiel 1 hergestellte Bibliothek verwendet. Die Vermehrung und Isolierung der Phagemide erfolgte genauso wie in Beispiel 2 beschrieben.

Als Peptidligand wurde ein biotinyliertes synthetisches Hepatitis C-Peptidepitop eingesetzt, bei dem es sich um das Peptidfragment Nr. 59 aus dem Oberflächenprotein NS4 von HCV handelte (Khudyakow et al., Virology 206 (1995), 666-672). Das
5 Peptid, SEQ ID NO:13, wurde nach der üblichen Fmoc-Methode mittels eines PS3 Automaten (RAININ Instrument Co.) synthetisiert, wobei Rink Amid MBHA-Harz (novabiochem) eingesetzt wurde. Im Anschluß an die Kopplung der Aminosäurebausteine vom C- zum N-Terminus wurde
10 Aminocaprinsäure als Boc-geschütztes Derivat und im letzten Schritt D-Biotin (Sigma) gekoppelt. Das vom Harz abgespaltene und entschützte Peptid wurde mittels HPLC gereinigt, und seine Zusammensetzung wurde durch ESI-Massenspektrometrie überprüft.

15 Zur Affinitätsanreicherung der die Anticalin-Fusionsproteine tragenden rekombinanten Phagemide wurden mit Streptavidin beschichtete superparamagnetische Partikel (Dynabeads M-280 Streptavidin, Dynal) verwendet. Die Menge des Peptidliganden wurde so eingestellt, daß dieser einerseits im molaren
20 Überschuß gegenüber den eingesetzten Phagemiden vorlag, und daß andererseits die Bindekapazität des Streptavidins für die Biotingruppen nicht überschritten wurde.

Dazu wurden 20 µl der Peptidlösung (20 µg/ml in PBS) mit 280
25 µl einer Lösung der frisch präparierten Phagemide ($3,0 \cdot 10^{12}$ cfu/ml) gemischt und für 1 h bei RT inkubiert, woraufhin 100 µl einer Lösung von 8 % w/v BSA, 0,4 % v/v Tween 20 in PBS zugegeben wurde. Parallel wurden 100 µl der kommerziell erhältlichen Suspension der magnetischen Partikel dreimal mit
30 jeweils 100 µl PBS gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 100 µl 2 % w/v BSA in PBST für 1 h bei RT inkubiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die magnetischen Partikel mit der Peptid/Phagemidmischung versetzt, resuspendiert und für 10 min
35 bei RT inkubiert. Zur Absättigung freier Biotin-Bindungsstellen des Streptavidins wurde die Mischung schließlich mit 10 µl einer Lösung von 4 µM Desthiobiotin in

PBS versetzt und für 5 min bei RT inkubiert.

Zur Entfernung nicht gebundener Phagemide wurden die magnetischen Partikel achtmal mit jeweils 1 ml PBST, 0,1 μ M Desthiobiotin gewaschen. Dazu wurden die magnetischen Partikel mit Hilfe eines Magneten an der Wand des 1,5 ml Eppendorfgefäßes gesammelt und der Überstand abgezogen. Danach wurden die magnetischen Partikel mit frischem Puffer resuspendiert und für 1 min durch Rotation des Gefäßes in Suspension gehalten. Die Elution der gebundenen Phagemide erfolgte durch 10minütige Inkubation der resuspendierten Partikel in 950 μ l 0,1 M Glycin/HCl pH 2,2. Der pH-Wert der Lösung wurde im Anschluß daran sofort durch Zugabe von 160 μ l 0,5 M Tris neutralisiert.

Anschließend wurden die eluierten Phagemide wie in Beispiel 2 beschrieben vermehrt und für eine erneute Affinitätsselektion unter den oben angegebenen Bedingungen eingesetzt. Insgesamt wurden 6 Selektionszyklen durchgeführt.

Beispiel 6: Identifizierung peptidbindender Anticaline mittels der "Colony Screening"-Methode

Zur analytischen Produktion der Anticaline als Fusionsprotein mit dem Strep-Tag II sowie der Albumin-Bindungsdomäne und deren Charakterisierung durch "Colony Screening" wurde die Genkassette zwischen den beiden BstXI-Schnittstellen aus dem Vektor pBBP20 in pBBP22 subkloniert.

Dazu wurde aus der Mischung der *E.coli*-Klone, die durch Infektion mit den im letzten Selektionszyklus eluierten Phagemiden aus Beispiel 6 erhalten worden waren, die Phasmid-DNA unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (QIAGEN) isoliert. Die DNA wurde mit dem Restriktionsenzym BstXI geschnitten und das kleinere der beiden Fragmente (335 bp) durch präparative Agarose-Gelelektrophorese wie in Beispiel 1 beschrieben gereinigt. In gleicher Weise wurde die DNA des

Vektors pBBP22 mit *Bst*XI geschnitten und das größere der beiden Fragmente (3545 bp) isoliert.

5 Zur Ligierung wurden jeweils 50 fmol der beiden DNA-Fragmente in einem Gesamtvolumen von 20 μ l (30 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP) mit 1,5 Weiss Units T4 DNA Ligase (Promega) versetzt und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Mit 5 μ l dieses Ligierungsansatzes wurde *E.coli* TG1-F⁻ nach der $CaCl_2$ -Methode transformiert.

10 Auf eine LB/Amp-Agarplatte wurde eine passend zurechtgeschnittene, an einer Stelle markierte hydrophile PVDF-Membran (Millipore, Typ GVWP, Porengröße 0,22 μ m) aufgelegt und auf dieser Membran 150 μ l der Zellsuspension aus dem Transformationsansatz gleichmäßig ausplattiert. Die Menge
15 des ausplattierten Transformationsansatzes war so bemessen, daß ca. 500 Kolonien erhalten wurden. Die Platte wurde für 6,5 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis die Kolonien eine mit dem Auge gut erkennbare Größe erreicht hatten.

20 In der Zwischenzeit wurde eine ebenfalls passend zurechtgeschnittene hydrophobe Membran (Millipore, Immobilon P, Porengröße 0,45 μ m) nach den Angaben des Herstellers mit PBS angefeuchtet. Anschließend wurde sie für 4 h bei RT in
25 einer Lösung von 10 mg/ml Human-Serumalbumin (HSA, Sigma) in PBS geschwenkt. Verbliebene Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit 3 % w/v BSA, 0,5 % v/v Tween 20 in PBS für 2 h bei RT abgesättigt. Die Membran wurde zweimal für
jeweils 10 min mit 20 ml PBS gewaschen und danach für 10 min
30 in 10 ml LB/Amp-Medium, dem 200 μ g/l Anhydrotetracyclin zugesetzt war, geschwenkt. Anschließend wurde sie an einer Stelle markiert und auf eine Kulturplatte mit LB/Amp-Agar, der zusätzlich 200 μ g/l Anhydrotetracyclin enthielt, gelegt. Die
mit den Kolonien bewachsene hydrophile Membran wurde so auf
35 die hydrophobe Membran aufgelegt, daß die beiden Markierungen zur Deckung kamen. Die Kulturplatte mit den beiden Membranen wurde bei 22 °C für 15 h inkubiert. Während dieser Phase

wurden die jeweiligen Lipocalinmoleküle von den Kolonien sekretiert und mittels der Albumin-Bindungsdomäne an dem HSA auf der unteren Membran immobilisiert.

5 Danach wurde die obere Membran mit den Kolonien auf eine frische LB/Amp-Agarplatte transferiert und bei 4 °C aufbewahrt. Die hydrophile Membran wurde abgenommen, dreimal für jeweils 10 min mit 20 ml PBST gewaschen und anschließend 1 h in 10 ml einer Lösung von 1 µM SEQ ID NO:13 in PBST
10 inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBST wurde für 1 h mit 10 ml Avidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (ExtrAvidin-AP-Konjugat, Sigma, 1:1000 verdünnt in PBST) inkubiert. Die Membran wurde anschließend für jeweils 5 min zweimal mit PBST und zweimal mit PBS gewaschen und für 10 min in AP-Puffer (0,1
15 M Tris/HCl pH 8,8, 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl₂) geschwenkt. Zur chromogenen Nachweisreaktion wurde die Membran in 10 ml AP-Puffer, dem 30 µl BCIP (50 µg/ml in Dimethylformamid) und 5 µl NBT (75 µg/ml in 70 % v/v Dimethylformamid) zugesetzt waren, inkubiert, bis an den Positionen einiger der Kolonien
20 deutliche Farbsignale zu erkennen waren. Auf diese Weise wurde die Bindungsaktivität der von diesen Kolonien produzierten Anticaline für den Peptidliganden nachgewiesen.

Acht dieser Kolonien wurden kultiviert. Ihre Plasmid-DNA wurde
25 isoliert und die Bbp-Genkassette einer Sequenzanalyse wie in Beispiel 3 unterzogen. Alle Klone wiesen dabei unterschiedliche Sequenzen auf. Die charakteristischen Aminosäuren der Anticaline HepC1 und HepC4 sind in Tabelle 1 angegeben.

30

Beispiel 7: Verwendung der Anticaline zum Nachweis des Hepatitis C-Peptidpitops in einem Sandwich-ELISA

Ausgehend von den in Beispiel 6 gefundenen Klonen wurden die
35 entsprechenden Anticaline als Fusionsproteine mit dem Strep-Tag II und der Albumin-Bindungsdomäne produziert. Die Genexpression erfolgte im 50 ml-Maßstab. Dazu wurden jeweils 4

ml LB/Amp-Medium mit einer Einzelkolonie von TG1-F⁻, die das jeweilige Plasmid trug, angeimpft und über Nacht bei 30 °C, 200 Upm inkubiert. 500 µl dieser Vorkultur wurden dann jeweils auf 50 ml LB/Amp-Medium überimpft und bei 22 °C, 200 Upm bis
5 zu einer OD₅₅₀ = 0,5 geschüttelt. Anschließend wurde mit 200 µg/l Anhydrotetracyclin (50 µl einer 200 µg/ml-Stammlösung in DMF) induziert und weitere 3 h bei 22 °C, 200 Upm geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (15 min, 4420 g, 4 °C) sedimentiert und jeweils in 1 ml kaltem Periplasma-
10 Aufschlußpuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe von 25 µl einer Lösung von 1 mg/ml Lysozym in dem Periplasma-Aufschlußpuffer wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Die Sphäroplasten wurden durch
15 Zentrifugation (15 min, 18500 g, 4 °C) sedimentiert, und der Überstand wurde als periplasmatischer Proteinextrakt in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Für den ELISA wurden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (ELISA-STRIP, 2x8 Well, KO, F-Form, Bindekapazität hoch,
20 Greiner) mit jeweils 200 µl einer Lösung von 20 mg/ml HSA in 50 mM NaHCO₃ pH 9,6 gefüllt und für 1 h bei RT inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurden unbelegte Bindungsstellen mit 200 µl 3 % w/v BSA in PBS mit 0,5 % v/v Tween 20 für 1 h abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurde jeweils
25 in die erste Vertiefung einer Reihe 50 µl des unverdünnten periplasmatischen Proteinextrakts gefüllt. In den darauffolgenden Vertiefungen jeder Reihe wurde zunächst je 50 µl PBS vorgelegt. Anschließend wurde jeweils in die zweite Vertiefung 50 µl des periplasmatischen Proteinextrakts
30 pipettiert, gemischt und davon ausgehend in den weiteren Vertiefungen der Reihe schrittweise 1:2-Verdünnungen zubereitet. Als Kontrolle diente der periplasmatische Proteinextrakt mit dem Bbp, der unter Verwendung von pBBP22 als Expressionsplasmid hergestellt worden war.

35 Nach 1 h Inkubation bei RT wurde erneut dreimal mit PBST gewaschen und anschließend jeweils 200 µl der Ligandenlösung

(SEQ ID NO:13, 1 μ M in PBST) in die Vertiefung pipettiert. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde dreimal mit PBST gewaschen und danach 50 μ l Avidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (ExtrAvidin-AP-Konjugat, Sigma), 1:1000 verdünnt in PBST, in
5 jede Vertiefung gefüllt. Es wurde erneut für 1 h bei RT inkubiert und anschließend zweimal mit PBST und zweimal mit PBS gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Anticaline erfolgte mittels chromogener Reaktion in Gegenwart von p-Nitrophenylphosphat. Dazu wurden 100 μ l einer Lösung von 0,5
10 mg/ml p-Nitrophenylphosphat (Amresco) in AP-Puffer in jede Vertiefung gefüllt und die Produktbildung durch Messung der Absorption bei 405 nm in einem SpectraMax 250-Photometer (Molecular Devices) als dA/dt-Wert gemessen.

15 Im Fall des Bbp ließen sich nur niedrige Signale nachweisen, während alle analysierten Anticaline eindeutige Bindung zeigten. Das Signal war für HepC1 am stärksten, gefolgt von HepC4. Die Bindungskurven für HepC1, HepC4 und Bbp sind in Figur 7 dargestellt.

20

Beispiel 8: Verwendung des Anticalins FluA zur Löschung der Eigenfluoreszenz von Fluorescein

25 Durch Fluoreszenztitration einer Lösung von Fluorescein mit unterschiedlichen Konzentrationen des Anticalins FluA wurde die Komplexbildung verfolgt. Gemessen wurde dabei die Abnahme der Intensität der Eigenfluoreszenz des Liganden Fluorescein. Die Messungen erfolgten mit einem LS 50 B
Fluoreszenzphotometer (Perkin Elmer) bei einer
30 Anregungswellenlänge von 490 nm (Spaltbreite 4 nm) und einer Emissionswellenlänge von 512 nm (Spaltbreite 4 nm).

Als Puffersystem diente PBS unter Zusatz von 1 mM EDTA mit pH 7,4 (mit NaOH eingestellt). Alle verwendeten Lösungen wurden
35 sterilfiltriert (0,45 μ m). Die Lösung des gereinigten Anticalins FluA aus Beispiel 3 wurde dreimal gegen diesen Puffer dialysiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte unter

Verwendung eines Extinktionskoeffizienten von $59755 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für FluA.

Für eine Meßreihe wurde ein Satz von 15 Lösungen mit einer
 5 konstanten Fluoresceinkonzentration von $1 \mu\text{M}$ und variierenden
 Proteinkonzentrationen von 0 bis $10 \mu\text{M}$ jeweils in einem
 Gesamtvolumen von $120 \mu\text{l}$ hergestellt. Dazu wurden je $6 \mu\text{l}$
 einer $20 \mu\text{M}$ Lösung von Fluorescein in dem genannten Puffer mit
 unterschiedlichen Volumina der Anticalin-Stammlösung versetzt
 10 und mit Puffer auf ein Gesamtvolumen von $120 \mu\text{l}$ aufgefüllt.

Zur Messung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der
 jeweiligen Konzentration des Anticalins wurden die einzelnen
 Lösungen in eine Quarz-Mikroküvette überführt und im
 15 Probenhalter des Photometers für 1 min auf 25°C temperiert.
 Anschließend wurde das Fluoreszenzsignal als Mittelwert über
 10 s gemessen. Nach Abzug des Fluoreszenzwertes für den Puffer
 wurden die Signale auf einen Anfangswert von 100 % skaliert.
 Eine darüber hinaus gehende Korrektur der Meßwerte erwies sich
 20 nicht als notwendig.

Es zeigte sich, daß die anfänglich hohe Fluoreszenzintensität
 des Fluoresceins mit zunehmender Konzentration des Anticalins
 erheblich abnahm, bis nur noch eine sehr geringe Fluoreszenz
 25 gemessen werden konnte. Die erhaltenen Meßwerte der
 Titrationsreihe wurden gemäß folgender Formel durch nicht-
 lineare Regression mit Hilfe des Computerprogramms
 Kaleidagraph (Abelbeck Software) angepaßt:

$$30 \quad F = ([L]_t - [P]_t - K_d) \frac{f_L}{2} + ([P]_t + [L]_t + K_d) \frac{f_{PL}}{2} + (f_L - f_{PL}) \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_d)^2}{4} - [P]_t [L]_t}$$

Dabei bedeuten F die skalierte Fluoreszenzintensität und $[L]_t$
 35 die Konzentration des Fluoresceins ($1 \mu\text{M}$). $[P]_t$ steht für die
 Gesamtkonzentration von FluA bei dem jeweiligen
 Titrationsschritt. f_{PL} und K_d wurden als freie Parameter an

die gemessenen Daten angepaßt und bezeichnen den Fluoreszenzkoeffizienten des Komplexes aus dem Anticalin A und Fluorescein sowie dessen thermodynamische Dissoziationskonstante.

5

Die gemessenen Fluoreszenz-Intensitätswerte und die daran angepaßte Ausgleichskurve sind in Figur 8 dargestellt. Als Dissoziationskonstante für den Komplex aus dem Anticalin FluA und Fluorescein wurde ein Wert von $35,2 \pm 3,2$ nM ermittelt.

10

Bei der Komplexbildung mit dem Anticalin FluA wurde die Fluoreszenzintensität von Fluorescein zu $99,7 \pm 0,3$ %, d. h. nahezu quantitativ gelöscht. In einem entsprechenden Kontrollexperiment mit dem rekombinanten BBP wurde keine vergleichbare Fluoreszenzlöschung gefunden.

15

Patentansprüche

1. Anticaline, herstellbar ausgehend von Polypeptiden der Lipocalinfamilie, indem Aminosäuren im Bereich der vier
5 Peptidschleifen, die an einem Ende der zylindrischen Faltblattstruktur angeordnet sind, mutiert werden, und die dadurch charakterisiert sind, daß sie einen vorgegebenen Liganden mit bestimmbarer Affinität binden.

10 2. Anticaline nach Anspruch 1, wobei das Lipocalin ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus dem Bilin-Bindungsprotein aus *Pieris brassicae*, dem Retinol-Bindungsprotein des Menschen und dem Apolipoprotein D des Menschen.

15 3. Anticaline nach Anspruch 1 oder 2, wobei es sich bei den mutierten Aminosäuren im Bereich der vier Peptidschleifen um die Sequenzpositionen 34 bis 37, 58, 60, 69, 88, 90, 93, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 des Bilin-Bindungsproteins oder
20 um die Sequenzpositionen 34 bis 37, 59, 61, 70, 87, 89, 92, 94, 96, 113, 115, 123 und 125 des Apolipoprotein D handelt.

4. Anticaline nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei weitere Aminosäuren in dem Lipocalin oder Anticalin
25 ausgetauscht werden, um die monomere Struktur des Anticalins zu stabilisieren, um Erkennungsstellen für Proteasen in dem Anticalin zu eliminieren oder um geeignete Restriktionsschnittstellen zur Manipulation der für die Lipocalinmoleküle oder das Anticalin kodierenden Nukleinsäuren
30 einzuführen.

5. Anticaline nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Ligand eine chemische Verbindung in freier oder konjugierter Form ist, die Merkmale eines immunologischen Haptens aufweist.

35 6. Anticaline nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Ligand ein Peptid, ein Polypeptid oder ein anderes

Makromolekül oder ein entsprechendes Konjugat davon ist.

7. Verfahren zur Herstellung von Anticalinen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, wobei die aus der
5 Mutagenese resultierende Nukleinsäure, die für die Bibliothek der Lipocalinmuttereine kodiert, zur Selektion des oder der Anticaline auf Bindung des vorgegebenen Liganden am 3'-Ende mit einem Gen, das für das Hüllprotein pIII eines filamentösen Bakteriophagen der M13-Familie oder für ein Fragment dieses
10 Hüllproteins kodiert, in operabler Weise fusioniert wird.

8. Verfahren zur Herstellung von Anticalinen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Anticalin, ein
15 Fragment des Anticalins oder ein Fusionsprotein aus dem Anticalin und einem anderen Polypeptid ausgehend von der für das Anticalin kodierenden Nukleinsäure mittels gentechnischer Methoden in einem bakteriellen oder eukaryontischen Wirtsorganismus produziert und aus diesem Wirtsorganismus oder dessen Kultur gewonnen wird.

20 9. Verwendung von Anticalinen oder von Fusionsproteinen aus Anticalinen und anderen Polypeptiden nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 zur Bindung an eine Festphase, so daß der Ligand des Anticalins oder ein Konjugat oder
25 Fusionsprotein dieses Liganden immobilisiert oder abgetrennt werden kann.

10. Verwendung von Anticalinen oder von Fusionsproteinen aus Anticalinen und anderen Polypeptiden nach einem oder
30 mehreren der Ansprüche 1 bis 6 zur Markierung mit einem Enzym, einem Antikörper, einer radioaktiven Substanz oder einer anderen Gruppe mit einer biochemischen Aktivität oder mit definierten Bindungseigenschaften, so daß der Ligand des Anticalins oder ein Konjugat oder Fusionsprotein dieses
35 Liganden damit nachgewiesen oder in Kontakt gebracht werden kann.

1/8

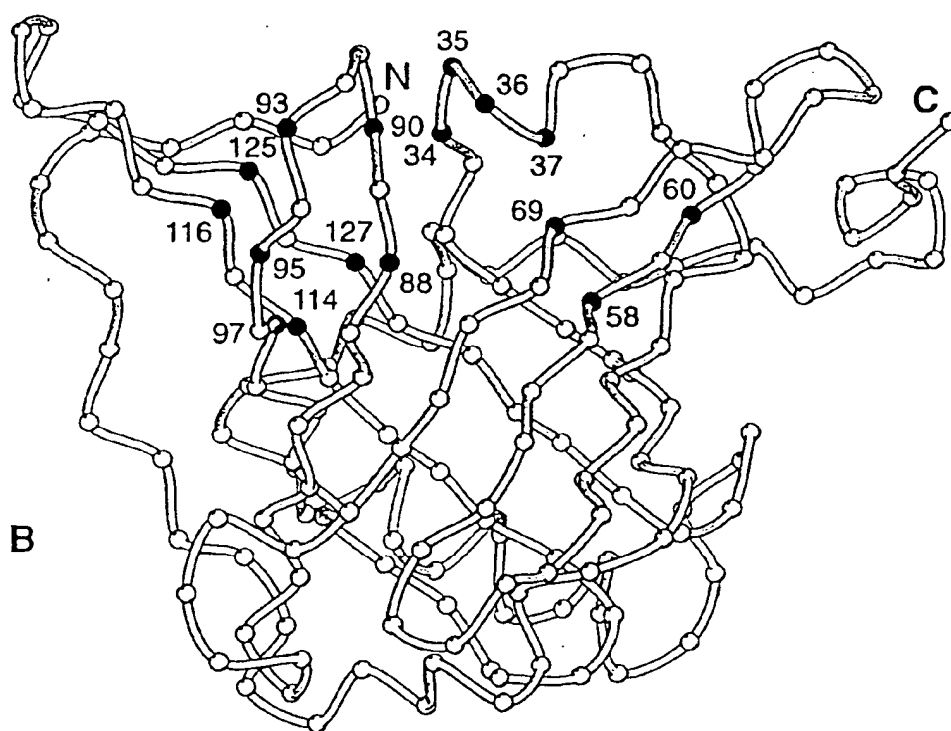
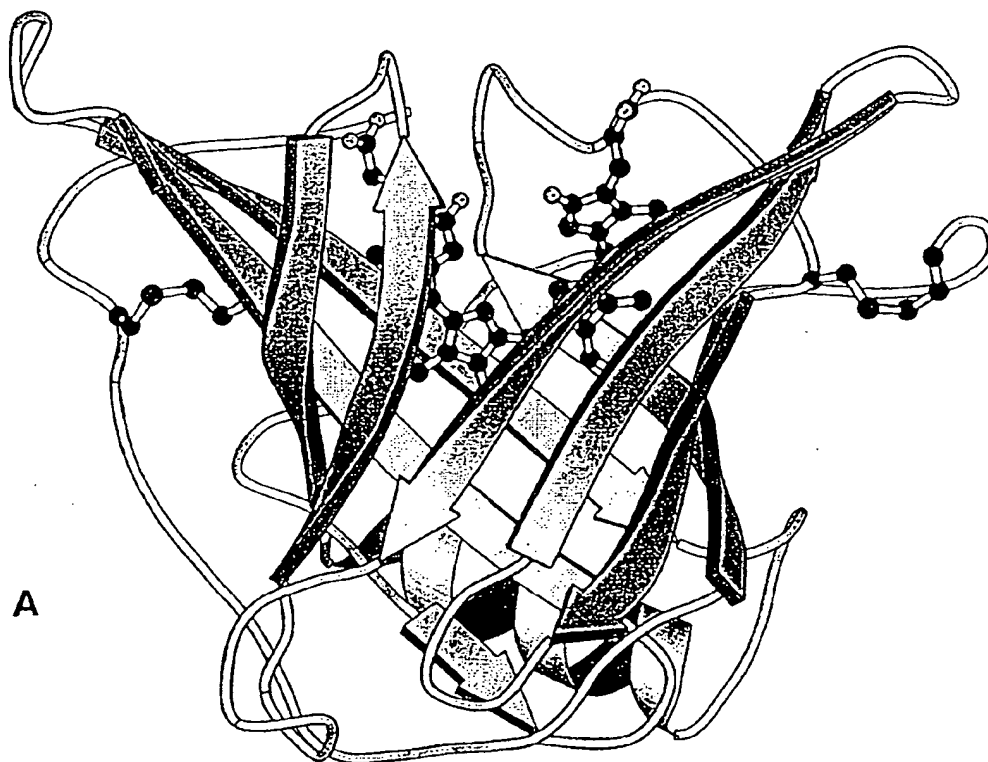


Fig. 1

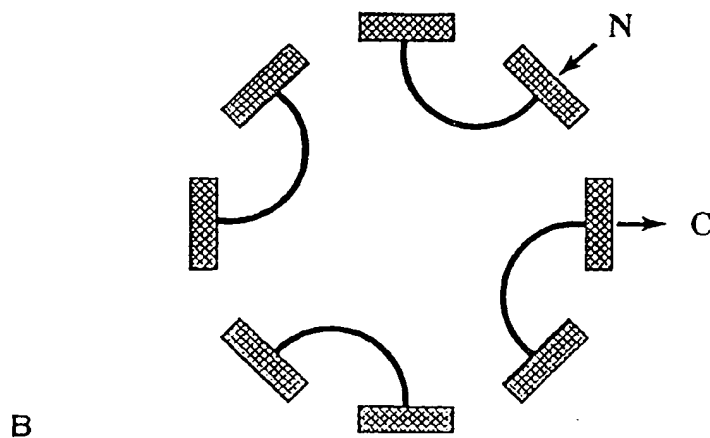
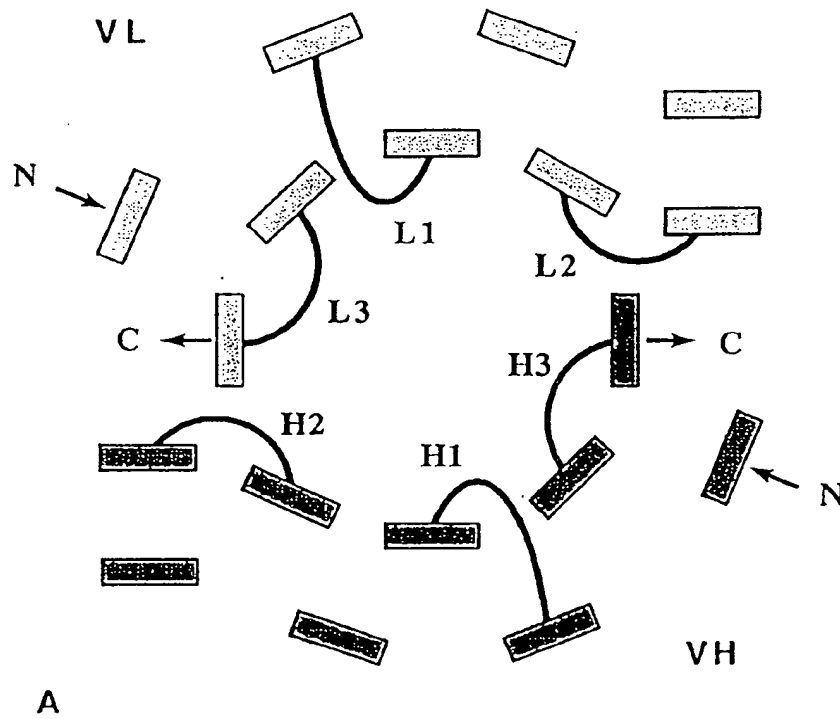


Fig. 2

```

Rbp      1  ERDCRVSSFRVKENFDKARFSGTWYAMAKKDPEGLFLQDNIVAEFSV. 47
ApoD     1  QAFHLGKCPNPPVQENFDVNKYLGRWYEIEKIPTTFEN.GRCIQANYSLM 49
Bbp      1  NVYHDGACPEVKPVDNFDWSNYHGKWWEVAKYPNSVEKYGKCGWAEYTP. 49
                * * * *
                =====

Rbp      48 DETGQMSATAKGRVRLNNWDVCADMVGTFDTEDP..AKFKMKYWGVAS 95
ApoD     50 ENGKIKVLNQELRADG.....TVNQIEGEATPVNLT..EPAKLEVKFSWF 92
Bbp      50 E.GKSVKVSNIYHVIHG.....KEYFIEGTAYPVGDSKIGKIYHKLTYYGGV 93
                * * * *
                =====

Rbp      96 FLQKGNDDHWIVDTDYDTYAVOYSCRLNLNDGTCADSYSFVFSRDPNGLP 145
ApoD     93 ...MPSAPYWILATDYENYALVYSCTCI.IQ.LFHVDFAWILARNPNL.P 136
Bbp      94 ...TKENVFENVLSTDNKNYIIGYYCKYD.EDKKGHQDFVWVLSRSKVL.T 138
                * * * *
                =====

Rbp      146 PEAQKIVRQRQEEL.CLA.RQYRLIVH...NGYCDGRSERNLL 183
ApoD     137 PETVDSLKNILT.SNNIDVKKMTVTD..QVNCPKLS 169
Bbp      139 GEAKTAVENYLIGSPVVD SQKLVYSDFSEAACKVNN 174

```

Fig. 3

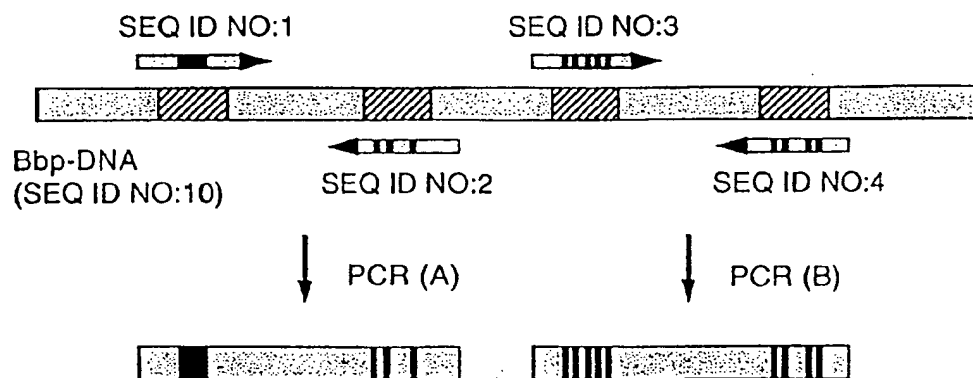
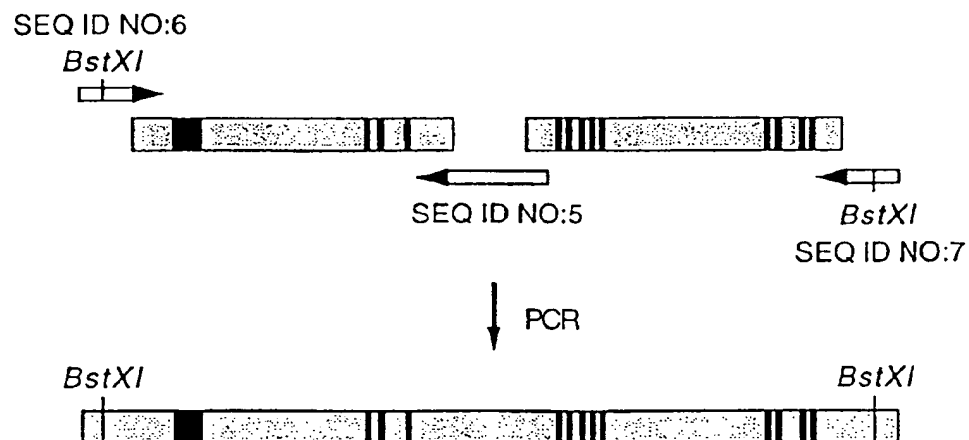
1. PCR (A + B)2. PCR

Fig. 4

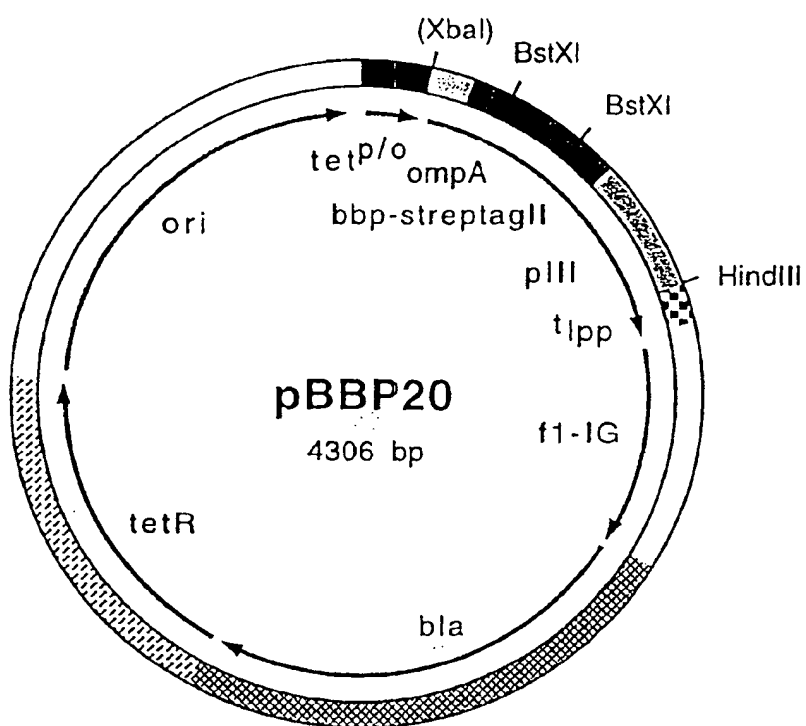


Fig. 5

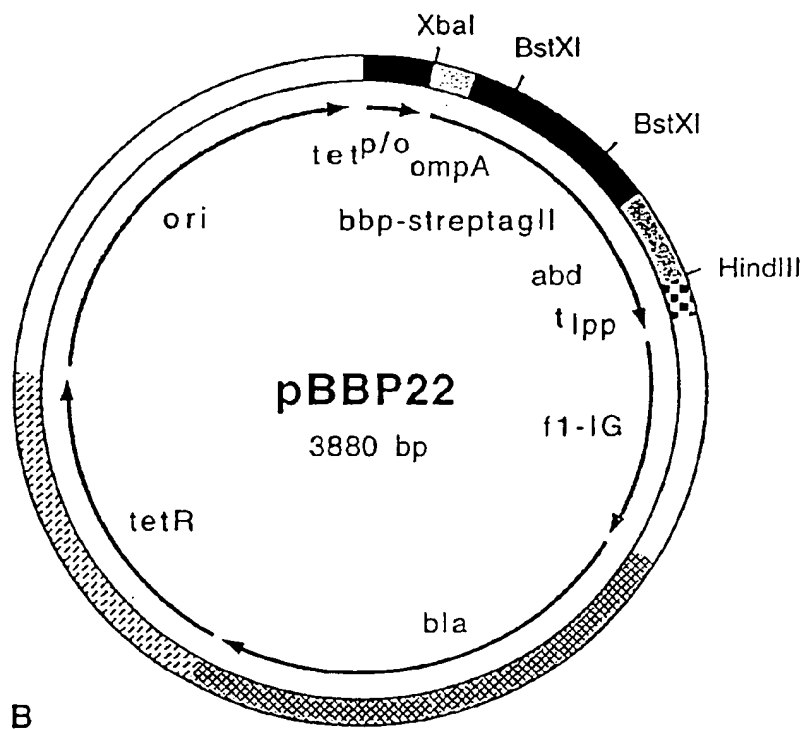
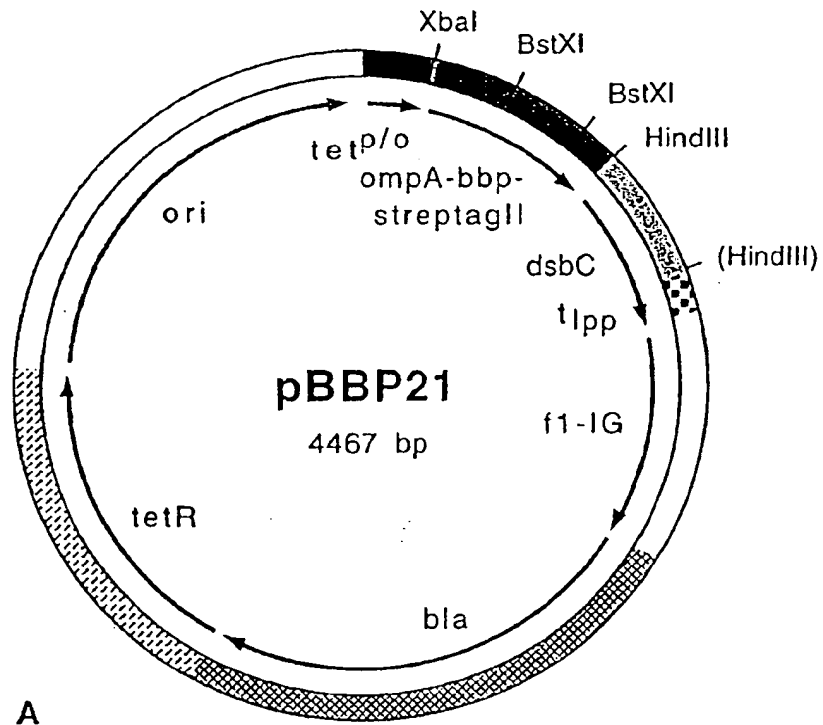


Fig. 6

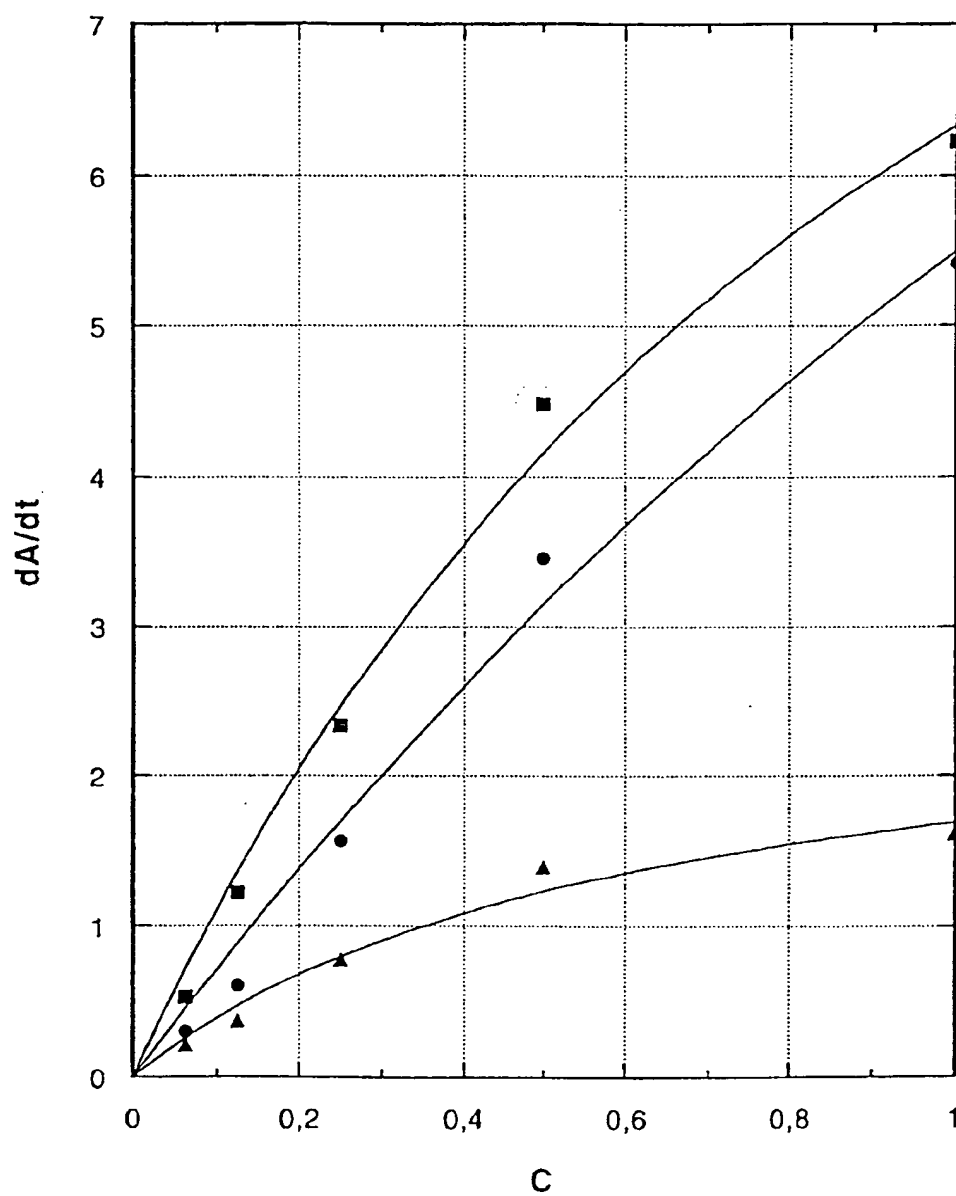


Fig. 7

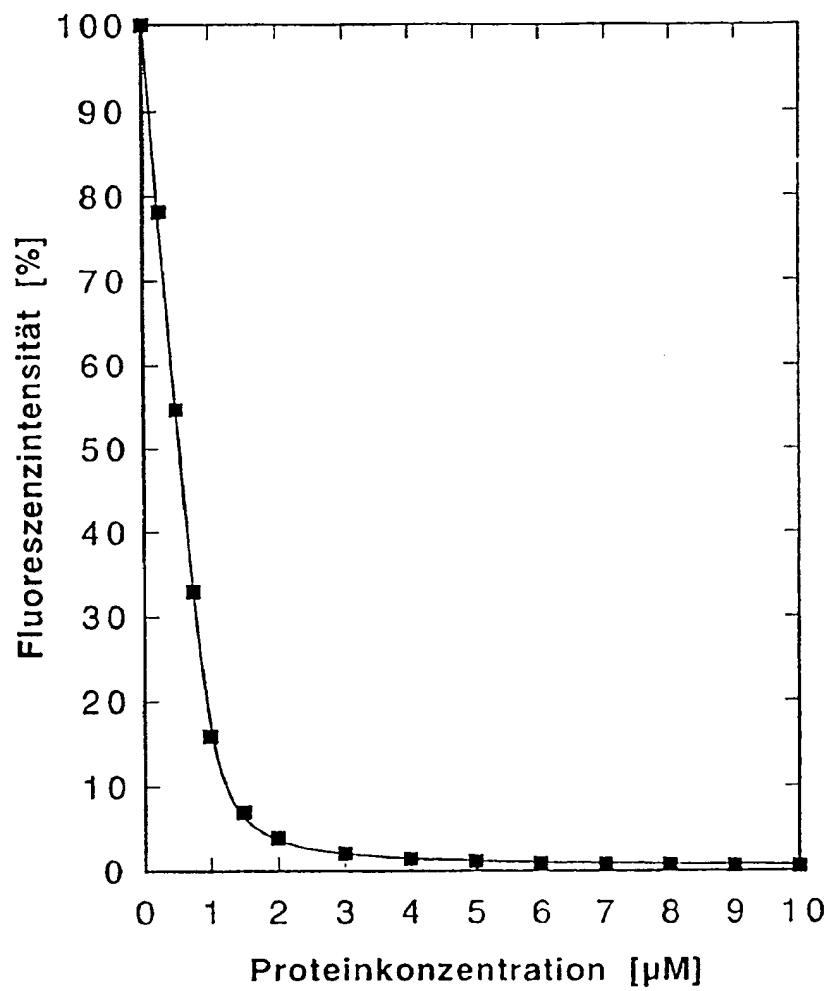


Fig. 8

Sequenzprotokoll

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Prof. Dr. Arne Skerra
- (B) STRASSE: Max-Lehner-Str. 18
- (C) ORT: Freising
- (D) LAND: Deutschland
- (E) POSTLEITZAHL: 85354

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Anticaline

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 13

(iv) COMPUTERLESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE:

(2) ANGABEN ZU SEQ ID-NO:1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 64 Basen
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:1:

CCATGGTAAA TGGTGGGAAG TCGCCAAATA CCCCNKNMS NNSNNKAAGT	50
ACGGAAAGTG CGGA	64

(2) ANGABEN ZU SEQ ID-NO:2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 71 Basen
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:2:

GGGTAGGCGG TACCTTCSNN AAAGTATTC TTGCCGTGGA TTACMNGTA	50
SNNCGAAACT TTGACACTCT T	71

(2) ANGABEN ZU SEQ ID-NO:3:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 74 Basen

- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:3:

```
CCAAGATTGG AAAGATCTAC CACAGCNNSA CTNNKGGAGG TNNSACCVVS 50
GAGNNKGTAT TCAACGTACT CTCC 74
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID-NO:4:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 78 Basen
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:4:

```
TCTGGAGAGC ACCCAGACMN NGTCSNNGTG TCCCTTCTTG TCCTCGTCGT 50
ASNNGCAMNN GTATCCGATG ATGTAGTT 78
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID-NO:5:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 46 Basen
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:5:

```
AGATCTTTCC AATCTTGGAG TCACCAACTG GGTAGGCGGT ACCTTC 46
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID-NO:6:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 36 Basen
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (E) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:6:

```
CTTCGACTGG TCCAGTACC ATGGTAAATG GTGGGA 36
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID-NO:7:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 37 Basen
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:7:

CACCAGTAAG GACCATGCTT CTGGAGAGCA CCCAGAC 37

(2) ANGABEN ZU SEQ ID-NO:8:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 17 Basen
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:8:

GACGGTGCCT GTCCCGA 17

(2) ANGABEN ZU SEQ ID-NO:9:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 17 Basen
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:9:

GACTACTGGG GAGCCGA 17

(2) ANGABEN ZU SEQ ID-NO:10:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 1219 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Fragment des Plasmids pBBP20

(ix) MERKMAL:
NAME/SCHLÜSSEL: Signalpeptid
LAGE: (22..84)

(ix) MERKMAL:
NAME/SCHLÜSSEL: reifes Peptid
LAGE: (85..1209)

SONSTIGE ANGABEN:
 /Produkt="Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein,
 Strep-Tag II und Fragment des Phagen-
 Hüllproteins pIII"
 /Codon=(Sequenz:"TAG", Aminosäure:Gln)

- (ix) MERKMAL:
 NAME/SCHLÜSSEL: kodierende Sequenz
 LAGE: (85..606)
 SONSTIGE ANGABEN:
 /Produkt="matures Bilin-Bindungsprotein"
- (ix) MERKMAL:
 NAME/SCHLÜSSEL: kodierende Sequenz
 LAGE: (607..636)
 SONSTIGE ANGABEN:
 /Produkt="Strep-Tag II-Affinitätsanhängsel"
- (ix) MERKMAL:
 NAME/SCHLÜSSEL: kodierende Sequenz
 LAGE: (637..639)
 SONSTIGE ANGABEN:
 /Sonstiges="Amber-Stopcodon"
- (ix) MERKMAL:
 NAME/SCHLÜSSEL: kodierende Sequenz
 LAGE: (640..1209)
 SONSTIGE ANGABEN:
 /Produkt="Aminosäuren 217-406 des Hüllproteins pIII"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:10:

```

TCTAGTTAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT      45
                        Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
                        -21 -20                      -15

GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GAC GTG 90
Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Asp Val
                        -10                      -5          -1   1

TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC AAC TTC 135
Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp Asn Phe
                        5                      10          15

GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG GAA GTC GCC AAA TAC 180
Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Glu Val Ala Lys Tyr
                        20                      25          30

CCC AAC TCA GTT GAG AAG TAC CGA AAG TGC GGA TGG GCT GAG TAC 225
Pro Asn Ser Val Glu Lys Tyr Gly Lys Cys Gly Trp Ala Glu Tyr
                        35                      40          45

ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG AAC TAC CAC GTA ATC 270
Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Asn Tyr His Val Ile
                        50                      55          60

```

CAC GGC AAG GAA TAC TTT ATT GAA GGA ACT GCC TAC CCA GTT GGT 315
His Gly Lys Glu Tyr Phe Ile Glu Gly Thr Ala Tyr Pro Val Gly
65 70 75

GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC CTG ACT TAC GGA GGT 360
Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Leu Thr Tyr Gly Gly
80 85 90

GTC ACC AAG GAG AAC GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC AAC AAG 405
Val Thr Lys Glu Asn Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp Asn Lys
95 100 105

AAC TAC ATC ATC GGA TAC TAC TGC AAA TAC GAC GAG GAC AAG AAG 450
Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Tyr Cys Lys Tyr Asp Glu Asp Lys Lys
110 115 120

GGA CAC CAA GAC TTC GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG GTC CTT 495
Gly His Gln Asp Phe Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met Val Leu
125 130 135

ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC GGC TCC 540
Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile Gly Ser
140 145 150

CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC TCT GAA 585
Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe Ser Glu
155 160 165

GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT AGC AAC TGG TCT CAC CCG CAG TTC 630
Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe
170 175 180

GAA AAA TAG GCT GGC GGC GGC TCT GGT GGT GGT TCT GGC GGC GGC 675
Glu Lys Gln Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
185 190 195

TCT GAG GGT GGT GGC TCT GAG GGT GGC GGT TCT GAG GGT GGC GGC 720
Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly
200 205 210

TCT GAG GGA GGC GGT TCC GGT GGT GGC TCT GGT TCC GGT GAT TTT 765
Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asp Phe
215 220 225

GAT TAT GAA AAG ATG GCA AAC GCT AAT AAG GGG GCT ATG ACC GAA 810
Asp Tyr Glu Lys Met Ala Asn Ala Asn Lys Gly Ala Met Thr Glu
230 235 240

AAT GCC GAT GAA AAC GCG CTA CAG TCT GAC GCT AAA GGC AAA CTT 855
Asn Ala Asp Glu Asn Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly Lys Leu
245 250 255

GAT TCT GTC GCT ACT GAT TAC GGT GCT GCT ATC GAT GGT TTC ATT 900
Asp Ser Val Ala Thr Asp Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe Ile
260 265 270

```

GGT GAC GTT TCC GGC CTT GCT AAT GGT AAT GGT GCT ACT GGT GAT 945
Gly Asp Val Ser Gly Leu Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp
      275                      280                      285

TTT GCT GGC TCT AAT TCC CAA ATG GCT CAA GTC GGT GAC GGT GAT 990
Phe Ala Gly Ser Asn Ser Gln Met Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp
      290                      295                      300

AAT TCA CCT TTA ATG AAT AAT TTC CGT CAA TAT TTA CCT TCC CTC 1035
Asn Ser Pro Leu Met Asn Asn Phe Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu
      305                      310                      315

CCT CAA TCG GTT GAA TGT CGC CCT TTT GTC TTT GGC GCT GGT AAA 1080
Pro Gln Ser Val Glu Cys Arg Pro Phe Val Phe Gly Ala Gly Lys
      320                      325                      330

CCA TAT GAA TTT TCT ATT GAT TGT GAC AAA ATA AAC TTA TTC CGT 1125
Pro Tyr Glu Phe Ser Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg
      335                      340                      345

GGT GTC TTT GCG TTT CTT TTA TAT GTT GCC ACC TTT ATG TAT GTA 1170
Gly Val Phe Ala Phe Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val
      350                      355                      360

TTT TCT ACG TTT GCT AAC ATA CTG CGT AAT AAG GAG TCT          1209
Phe Ser Thr Phe Ala Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser
      365                      370                      375

TAATAAGCTT          1219

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID-NO:11:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1380 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Fragment des Plasmids pBBP21

(ix) MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: Signalpeptid
LAGE: (22..84)

(ix) MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: reifes Peptid
LAGE: (85..636)
SONSTIGE ANGABEN:
/Produkt="Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein und
Strep-Tag II"

(ix) MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: Signalpeptid
LAGE: (658..717)

(ix) MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: reifes Peptid
 LAGE: (718..1365)
 SONSTIGE ANGABEN:
 /Produkt="DsbC-Protein"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:11:

```

TCTAGATAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT 45
      Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
      -21 -20                      -15

GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GAC GTG 90
Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Asp Val
      -10                      -5          -1  1

TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC AAC TTC 135
Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp Asn Phe
      5                      10          15

GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG GAA GTC GCC AAA TAC 180
Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Glu Val Ala Lys Tyr
      20                      25          30

CCC AAC TCA GTT GAG AAG TAC GGA AAG TGC GGA TGG GCT GAG TAC 225
Pro Asn Ser Val Glu Lys Tyr Gly Lys Cys Gly Trp Ala Glu Tyr
      35                      40          45

ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG AAC TAC CAC GTA ATC 270
Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Asn Tyr His Val Ile
      50                      55          60

CAC GGC AAG GAA TAC TTT ATT GAA GGA ACT GCC TAC CCA GTT GGT 315
His Gly Lys Glu Tyr Phe Ile Glu Gly Thr Ala Tyr Pro Val Gly
      65                      70          75

GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC CTG ACT TAC GGA GGT 360
Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Leu Thr Tyr Gly Gly
      80                      85          90

GTC ACC AAG GAG AAC GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC AAC AAG 405
Val Thr Lys Glu Asn Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp Asn Lys
      95                      100         105

AAC TAC ATC ATC GGA TAC TAC TGC AAA TAC GAC GAG GAC AAG AAG 450
Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Tyr Cys Lys Tyr Asp Glu Asp Lys Lys
      110                      115         120

GGA CAC CAA GAC TTC GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG GTC CTT 495
Gly His Gln Asp Phe Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met Val Leu
      125                      130         135

ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC GGC TCC 540
Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile Gly Ser
      140                      145         150

```

CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC TCT GAA 585
 Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe Ser Glu
 155 160 165

GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT AGC AAC TGG TCT CAC CCG CAG TTC 630
 Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe
 170 175 180

GAA AAA TAATAAGCTT CGGGAAGATT T ATG AAG AAA GGT TTT ATG 675
 Glu Lys Met Lys Lys Gly Phe Met
 -20 -15

TTG TTT ACT TTG TTA GCG GCG TTT TCA GGC TTT GCT CAG GCT GAT 720
 Leu Phe Thr Leu Leu Ala Ala Phe Ser Gly Phe Ala Gln Ala Asp
 -10 -5 -1 1

GAC GCG GCA ATT CAA CAA ACG TTA GCC AAA ATG GGC ATC AAA AGC 765
 Asp Ala Ala Ile Gln Gln Thr Leu Ala Lys Met Gly Ile Lys Ser
 5 10 15

AGC GAT ATT CAG CCC GCG CCT GTA GCT GGC ATG AAG ACA GTT CTG 810
 Ser Asp Ile Gln Pro Ala Pro Val Ala Gly Met Lys Thr Val Leu
 20 25 30

ACT AAC AGC GGC GTG TTG TAC ATC ACC GAT GAT GGT AAA CAT ATC 855
 Thr Asn Ser Gly Val Leu Tyr Ile Thr Asp Asp Gly Lys His Ile
 35 40 45

ATT CAG GGG CCA ATG TAT GAC GTT AGT GGC ACG GCT CCG GTC AAT 900
 Ile Gln Gly Pro Met Tyr Asp Val Ser Gly Thr Ala Pro Val Asn
 50 55 60

GTC ACC AAT AAG ATG CTG TTA AAG CAG TTG AAT GCG CTT GAA AAA 945
 Val Thr Asn Lys Met Leu Leu Lys Gln Leu Asn Ala Leu Glu Lys
 65 70 75

GAG ATG ATC GTT TAT AAA GCG CCG CAG GAA AAA CAC GTC ATC ACC 990
 Glu Met Ile Val Tyr Lys Ala Pro Gln Glu Lys His Val Ile Thr
 80 85 90

GTG TTT ACT GAT ATT ACC TGT GGT TAC TGC CAC AAA CTG CAT GAG 1035
 Val Phe Thr Asp Ile Thr Cys Gly Tyr Cys His Lys Leu His Glu
 95 100 105

CAA ATG GCA GAC TAC AAC GCG CTG GGG ATC ACC GTG CGT TAT CTT 1080
 Gln Met Ala Asp Tyr Asn Ala Leu Gly Ile Thr Val Arg Tyr Leu
 110 115 120

GCT TTC CCG CGC CAG GGG CTG GAC AGC GAT GCA GAG AAA GAA ATG 1125
 Ala Phe Pro Arg Gln Gly Leu Asp Ser Asp Ala Glu Lys Glu Met
 125 130 135

AAA GCT ATC TGG TGT GCG AAA GAT AAA AAC AAA GCG TTT GAT GAT 1170
 Lys Ala Ile Trp Cys Ala Lys Asp Lys Asn Lys Ala Phe Asp Asp
 140 145 150

GTG ATG GCA GGT AAA AGC GTC GCA CCA GCC AGT TGC GAC GTG GAT 1215
 Val Met Ala Gly Lys Ser Val Ala Pro Ala Ser Cys Asp Val Asp
 155 160 165

ATT GCC GAC CAT TAC GCA CTT GGC GTC CAG CTT GGC GTT AGC GGT 1260
 Ile Ala Asp His Tyr Ala Leu Gly Val Gln Leu Gly Val Ser Gly
 170 175 180

ACT CCG GCA GTT GTG CTG AGC AAT GGC ACA CTT GTT CCG GGT TAC 1305
 Thr Pro Ala Val Val Leu Ser Asn Gly Thr Leu Val Pro Gly Tyr
 185 190 195

CAG CCG CCG AAA GAG ATG AAA GAA TTC CTC GAC GAA CAC CAA AAA 1350
 Gln Pro Pro Lys Glu Met Lys Glu Phe Leu Asp Glu His Gln Lys
 200 205 210

ATG ACC AGC GGT AAA TAATTCGCGT AGCTT 1380
 Met Thr Ser Gly Lys
 215

(2) ANGABEN ZU SEQ ID-NO:12:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 793 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Fragment des Plasmids pBBP22

(ix) MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: Signalpeptid
 LAGE: (22..84)

(ix) MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: reifes Peptid
 LAGE: (85..783)
 SONSTIGE ANGABEN:
 /Produkt="Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein,
 Strep-Tag II und Albumin-Bindungsdomäne"

(ix) MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: kodierende Sequenz
 LAGE: (85..606)
 SONSTIGE ANGABEN:
 /Produkt="matures Bilin-Bindungsprotein"

(ix) MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: kodierende Sequenz
 LAGE: (607..636)
 SONSTIGE ANGABEN:
 /Produkt="Strep-Tag II-Affinitätsanhängsel"

(ix) MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: kodierende Sequenz
 LAGE: (637..783)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Albumin-Bindungsdomäne aus Protein G"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:12:

TCTAGATAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT 45
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
 -21 -20 -15

GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GAC GTG 90
 Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Asp Val
 -10 -5 -1 1

TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC AAC TTC 135
 Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp Asn Phe
 5 10 15

GAC TGG TCC CAG TAC CAT GGT AAA TGG TGG GAA GTC GCC AAA TAC 180
 Asp Trp Ser Gln Tyr His Gly Lys Trp Trp Glu Val Ala Lys Tyr
 20 25 30

CCC AAC TCA GTT GAG AAG TAC GGA AAG TGC GGA TGG GCT GAG TAC 225
 Pro Asn Ser Val Glu Lys Tyr Gly Lys Cys Gly Trp Ala Glu Tyr
 35 40 45

ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG AAC TAC CAC GTA ATC 270
 Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Asn Tyr His Val Ile
 50 55 60

CAC GGC AAG GAA TAC TTT ATT GAA GGA ACT GCC TAC CCA GTT GGT 315
 His Gly Lys Glu Tyr Phe Ile Glu Gly Thr Ala Tyr Pro Val Gly
 65 70 75

GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC CTG ACT TAC GGA GGT 360
 Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Leu Thr Tyr Gly Gly
 80 85 90

GTC ACC AAG GAG AAC GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC AAC AAG 405
 Val Thr Lys Glu Asn Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp Asn Lys
 95 100 105

AAC TAC ATC ATC GGA TAC TAC TGC AAA TAC GAC GAG GAC AAG AAG 450
 Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Tyr Cys Lys Tyr Asp Glu Asp Lys Lys
 110 115 120

GGA CAC CAA GAC TTC GTC TGG GTG CTC TCC AGA AGC ATG GTC CTT 495
 Gly His Gln Asp Phe Val Trp Val Leu Ser Arg Ser Met Val Leu
 125 130 135

ACT GGT GAA GCC AAG ACC GCT GTC GAG AAC TAC CTT ATC GGC TCC 540
 Thr Gly Glu Ala Lys Thr Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile Gly Ser
 140 145 150

CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC TCT GAA 585
 Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe Ser Glu
 155 160 165

11

GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT AGC AAC TGG TCT CAC CCG CAG TTC 630
 Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn Ser Asn Trp Ser His Pro Gln Phe
 170 175 180

GAA AAA CCA GCT AGC CTG GCT GAA GCT AAA GTT CTG GCT AAC CGT 675
 Glu Lys Pro Ala Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg
 185 190 195

GAA CTG GAC AAA TAC GGT GTT TCC GAC TAC TAC AAA AAC CTC ATC 720
 Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile
 200 205 210

AAC AAC GCT AAA ACC GTT GAA GGT GTT AAA GCT CTG ATC GAC GAA 765
 Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu
 215 220 225

ATT CTC GCA GCA CTG CCG TAATAAGCTT 793
 Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 230

(2) ANGABEN ZU SEQ ID-NO:13:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Peptid

(ix) MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: sonstige Merkmale

LÄGE: 1

SONSTIGE ANGABEN: Xaa ist Biotinamidocaproyl

(ix) MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: sonstige Merkmale

LÄGE: 7

SONSTIGE ANGABEN: C-Terminus ist Amid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:13:

Xaa Ser Pro Thr His Tyr Val
 1 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 98/02898

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C12N15/62 C12N15/86 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MULLER H N ET AL: "Functional expression of the uncomplexed serum retinol-binding protein in Escherichia coli. Ligand binding and reversible unfolding characteristics" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, (1993 APR 5) 230 (3) 725-32. JOURNAL CODE: J6V. ISSN: 0022-2836., XP002095121 ENGLAND: United Kingdom see in particular page 727 right column 1 paragraph, page 731 left column 4 paragraph ---	1,2,4
X	WO 96 23879 A (TERRAPIN TECH INC ;KAUVAR LAWRENCE M (US); TRAINER JOHN A (US); VI) 8 August 1996 see the whole document, in particular example 9C --- -/--	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 March 1999

Date of mailing of the international search report

16/03/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 98/02898

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MUELLER, HOLGER N. ET AL: "Grafting of a High-Affinity Zn(II)- Binding Site on th.beta.-Barrel of Retinol - Binding Protein Results in Enhanced Folding Stability and Enables Simplified Purification" BIOCHEMISTRY (1994), 33(47), 14126-35 CODEN: BICHAW;ISSN: 0006-2960, XP002095122 see the whole document ---	1-10
A	SCHMIDT F S ET AL: "The bilin-binding protein of Pieris brassicae. cDNA sequence and regulation of expression reveal distinct features of this insect pigment protein." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, (1994 FEB 1) 219 (3) 855-63. JOURNAL CODE: EMZ. ISSN: 0014-2956., XP002095123 GERMANY: Germany, Federal Republic of cited in the application see the whole document ---	1-10
A	SIVAPRASADARAO A. ET AL: "Lipocalin structure and function." BIOCHEM. SOC. TRANS., (1993) 21/3 (619-622). ISSN: 0300-5127 CODEN: BCSTB5, XP002095124 United Kingdom see in particular page 619 right column 2 paragraph page 620 left column ---	1-10
A	FLOWER D.: "Multiple molecular recognition properties of the lipocalin proteinfamily" JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, vol. 8, 1995, pages 185-195, XP002095125 see page 186 - page 191 ---	1-10
A	FLOWER D.: "The lipocalin protein family: structure and function" BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 318, 1996, pages 1-14, XP002095126 cited in the application see the whole document ---	1-10
T	SUNDARAM M. ET AL.: "Expression, characterization and engineered specificity of rat epididymal retinoic-acid binding protein" BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 334, no. 1, 15 August 1998, pages 155-160, XP002095127 see in particular page 158 right column - page 159 -----	1-10

Information on patent family members

PCT/DE 98/02898

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

I nationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/02898

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/12 C12N15/62 C12N15/86 G01N33/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K C12N G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MULLER H N ET AL: "Functional expression of the uncomplexed serum retinol-binding protein in Escherichia coli. Ligand binding and reversible unfolding characteristics" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, (1993 APR 5) 230 (3) 725-32. JOURNAL CODE: J6V. ISSN: 0022-2836., XP002095121 ENGLAND: United Kingdom siehe insbesondere S.727 r.Sp. 1.Abs.; S.731 l.Sp. 4.Abs.	1,2,4
X	WO 96 23879 A (TERRAPIN TECH INC ;KAUVAR LAWRENCE M (US); TRAINER JOHN A (US); VI) 8. August 1996 siehe das ganze Dokument, insbes. Beispiel 9C	1-10

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgetüht)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Δ" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. März 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

16/03/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kania, T

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/02898

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
A	<p>MUELLER, HOLGER N. ET AL: "Grafting of a High-Affinity Zn(II)- Binding Site on the beta.-Barrel of Retinol - Binding Protein Results in Enhanced Folding Stability and Enables Simplified Purification"</p> <p>BIOCHEMISTRY (1994), 33(47), 14126-35 CODEN: BICHAW;ISSN: 0006-2960, XP002095122 siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-10
A	<p>SCHMIDT F S ET AL: "The bilin-binding protein of Pieris brassicae. cDNA sequence and regulation of expression reveal distinct features of this insect pigment protein."</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, (1994 FEB 1) 219 (3) 855-63. JOURNAL CODE: EMZ. ISSN: 0014-2956., XP002095123 GERMANY: Germany, Federal Republic of in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-10
A	<p>SIVAPRASADARAO A. ET AL: "Lipocalin structure and function."</p> <p>BIOCHEM. SOC. TRANS., (1993) 21/3 (619-622). ISSN: 0300-5127 CODEN: BCSTB5, XP002095124 United Kingdom siehe insbes. S.619 r.Sp. 2.Abs. - S.620 l.Sp.</p> <p>---</p>	1-10
A	<p>FLOWER D.: "Multiple molecular recognition properties of the lipocalin protein family"</p> <p>JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, Bd. 8, 1995, Seiten 185-195, XP002095125 siehe Seite 186 - Seite 191</p> <p>---</p>	1-10
A	<p>FLOWER D.: "The lipocalin protein family: structure and function"</p> <p>BIOCHEMICAL JOURNAL, Bd. 318, 1996, Seiten 1-14, XP002095126 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-10
T	<p>SUNDARAM M. ET AL.: "Expression, characterization and engineered specificity of rat epididymal retinoic-acid binding protein"</p> <p>BIOCHEMICAL JOURNAL, Bd. 334, Nr. 1, 15. August 1998, Seiten 155-160, XP002095127 siehe insbes. S.158 r.Sp. - S.159</p> <p>-----</p>	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/02898

Inm Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9623879 A	08-08-1996	AU 5132096 A	21-08-1996

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.